ÜBER DEN LIPIDSTOFFWECHSEL DER KÜKENLUNGE IM VERLAUF DER PERINATALEN ENTWICKLUNGSPHASE

von Winfried Hammel

Diss
München
1984

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544311_0074

Aus dem Institut für

Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. H. Zucker

Angefertigt unter der Leitung von

Priv. Doz. Dr. Dr. habil. J. Wittmann

ÜBER DEN LIPIDSTOFFWECHSEL DER KÜKENLUNGE IM VERLAUF DER PERINATALEN ENTWICKLUNGSPHASE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Winfried Hammel

aus Bad Mergentheim

München 1983

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät

der Universität München

Dekan: Prof. Dr. W. Leidl

Referent: Priv. Doz. Dr. Dr. habil. J. Wittmann

Korreferent: Prof. Dr. A. Petter

Tag der Promotion: 24. Februar 1984

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I.	ALLGEMEINER TEIL	1
1.	Einleitung	1
2.	Bau und Funktion der Vogellunge	2
3.	Entwicklung der Atmung beim Vogel	4
4.	Der Surfactant: Zusammensetzung, Aufgaben, Regulation der Synthese	6
5.	Synthese des Phosphatidylcholins	9
6.	Zielsetzung	10
II.	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	12
1.	Material und Methoden	12
a)	Reagenzien und Chemikalien	12
b)	Bedingungen für die Versuchstiere	12
c)	Bestimmungen aus dem Lungenlyophilisat	13
	- Herstellung des Lyophilisates	13
	- Bestimmung des Hämoglobingehaltes	13
	- Bestimmung der Lungenlipide	14
	- Bestimmung des DNS-Gehaltes	15
d)	Bestimmung der Lipide im Serum	16
e)	Bestimmung des Einbaus von [Methyl-^{14}C]-Cholinchlorid und L-[Methyl-^{3}H] Methionin in Phosphatidylcholin	16
f)	Bestimmung des Einbaus von L-[U-^{14}C]-Leucin in das Lungenprotein	18
g)	Bestimmung des O_2-Verbrauchs der embryonalen Küken	19

Inhaltsverzeichnis

Seite

h) Messung des Glucoseumsatzes in Lungenschnitten 19

i) Statistische Auswertung 20

2. Ergebnisse 20

a) Die Auswirkungen der applizierten Substanzen auf den Schlupf und die Atmung 20

b) Lipide in der lyophilisierten Kükenlunge 22

c) In-vitro-Versuche über die Phosphatidylcholinsynthese 25

d) Serumspiegel von Triglyceriden, Cholesterin und Phosphatidylcholin 30

e) Hämoglobingehalt der lyophilisierten Kükenlunge 34

f) Der Einbau von L-$\left[U\text{-}^{14}C\right]$ Leucin in das Lungenprotein 38

g) Die Metabolisierung von Glucose in Lungenschnitten 38

h) DNS-Gehalt der lyophilisierten Kükenlunge 40

III. DISKUSSION 42

IV. ZUSAMMENFASSUNG 47

V. ABSTRACT 49

VI. LITERATURVERZEICHNIS 50

I. ALLGEMEINER TEIL

1. Einleitung

Die Natur hat verschiedene Wege entwickelt, um Organismen mit O_2 zu versorgen. Bei den Einzellern und kleinen Metazoa geschieht dies ausschließlich durch Diffusion. Bei den höher entwickelten Organismen wird die Transportstrecke zu lang, als daß die O_2-Versorgung über die Diffusion allein ausreichen könnte. PIIPER und SCHEID (58) geben ca. 1 mm als äußerste Entfernung an, über die ein Gewebe ausreichend allein durch Diffusion mit O_2 versorgt werden kann. Bei den höher entwickelten Organismen ist deswegen ein besonderes Transportsystem für O_2 - der Blutkreislauf - und zusätzlich ein Organ zum Gasaustausch - die Lunge bzw. die Kiemen - erforderlich.

Besondere Verhältnisse sind bei den höher entwickelten Lebewesen während der Embryogenese gegeben. Da die Reifung der Lunge erst kurz vor dem Ende der Embryonalphase abgeschlossen ist, steht sie für den Gasaustausch nicht zur Verfügung. Bei den Säugetierembryonen erfolgt der Gasaustausch über das Gefäßsystem der Placenta, wobei die Aufnahme von O_2 und die Abgabe von CO_2 über die mütterliche Lunge erfolgt. Im Gegensatz dazu ist beim Vogelembryo keine mütterliche Lunge vorgeschaltet. Der Gasaustausch mit der Umwelt wird hier direkt über die Diffusion durch die Eischale vollzogen. Die Unabhängigkeit des Gasaustausches von einem Muttertier ist offensichtlich auch die Voraussetzung dafür, daß die Entfaltung der Lunge am Ende der Embryogenese sich über einen längeren Zeitraum hin vollziehen kann (vgl. 3.). Die biochemischen Vorgänge, die hierbei ablaufen, sind weitgehend unbekannt.

Beim Säugetier wird bei der Entfaltung der Lunge dem Lipidstoffwechsel eine wichtige Funktion zuerkannt. In der vorliegenden

Arbeit wurde daher untersucht, inwiefern dem Lipidstoffwechsel auch bei der Entfaltung der Kükenlunge eine Funktion zukommt.

2. Bau und Funktion der Vogellunge

Die Vogellunge ist dorsal an den Rippenbogen fixiert und ventral durch ein horizontales Septum von den Luftsäcken und Eingeweiden getrennt. Während der Atmung bleibt das Volumen der Vogellunge nahezu konstant. Dies ist dadurch bedingt, daß die Lunge weit dorsal und damit in einem Bereich des Rippenbogens liegt, in dem Bewegungen nur noch in kleinem Ausmaß möglich sind. Diese kleinen Bewegungen werden durch die Tätigkeit von Muskeln, die vom Rippenbogen zum horizontalen Septum ziehen, weitgehend ausgeglichen.

In der stammesgeschichtlichen Reihe der Sauropsiden stellt die Vogellunge die höchste Stufe der Entwicklung dar (25). Auffallend ist der hier besonders geringe Durchmesser der terminalen Luftwege, der Luftkapillaren. Er beträgt nur 3 - 10 µm. Daraus resultiert eine sehr hohe Oberflächenspannung. Deshalb sind beim Vogel zyklische Änderungen des Lungenvolumens nur in sehr kleinem Umfang möglich, ohne ein Kollabieren der Luftkapillaren (trotz Surfactant) und eine Blockierung des Gasaustausches hervorzurufen. Die Beatmung der weitgehend starren Vogellunge ist nur mit Hilfe der Luftsäcke möglich. Sie dienen als Blasebälge, auf welche die Atembewegungen einwirken. Der Weg, den der Luftstrom durch die Lunge nimmt, hängt davon ab, wie die Sekundärbronchen aus dem Primärbronchus abzweigen und wie sie mit den Luftsäcken in Verbindung stehen.

Ein dreidimensionales Netz aus Blut- und Luftkapillaren bildet die Wand der Parabronchen, der funktionellen Einheit der Vogellunge (51). Die Parabronchen sind langgestreckte Röhren, die die Reihen der Sekundärbronchen miteinander verbinden. Das Netz glatter

Muskulatur in den Parabronchen hat die Aufgabe, den Luftstrom zu regulieren. Dies geschieht durch die Änderung des Durchmessers und somit des Luftwiderstandes. Die hohe Gasaustauschkapazität der Vogellunge ist einerseits bedingt durch die Länge der Parabronchen, andererseits durch die besondere Anordnung der Blutkapillaren, die von außerhalb der Parabronchen aus Arteriolen kommend auf der Lumenseite hauptsächlich von Venolen gesammelt werden.

Das Epithel der Luftkapillaren wird von einem Film aus oberflächenaktivem Material, dem Surfactant, ausgekleidet, dessen Funktion beim Vogel umstritten ist (s. u.). Die geschilderten anatomischen Gegebenheiten haben zur Folge, daß die Entfaltung der Vogellunge binnen weniger Atemzüge nicht möglich ist. Die Entfaltung der Kükenlunge dauert in der Regel 10 - 12 h. In dieser Zeit hat der Vogelembryo jedoch die Möglichkeit, den benötigten O_2 auch über die Chorioallantoismembran zu beziehen. Deshalb ist es für ihn im Gegensatz zum Säugetier nicht lebenswichtig, daß die Lunge innerhalb weniger Atemzüge die volle O_2-Versorgung übernehmen kann.

Die Säugetierlunge weist während des Atemzyklus große Volumenunterschiede auf. Das Vorhandensein eines Zwerchfells und die weniger dorsale Lage der Lunge bedingen, daß die Bewegungen des Brustkorbs viel stärker als bei der Vogellunge auf das Volumen der Säugetierlunge einwirken können. Zusätzlich wird die schnelle Entfaltung der Lunge bei der Geburt durch ihr alveoläres Bauprinzip unterstützt (1). Der im Gegensatz zu den Luftkapillaren der Vogellunge größere und relativ konstante Durchmesser der Lungenalveolen der Säugetierlunge läßt in Verbindung mit dem Surfactant, der das Alveolarepithel auskleidet, eine Beatmung der Alveolen aus nahezu kollabiertem Zustand heraus zu.

3. Entwicklung der Atmung beim Vogel

Wie bereits angeführt, erfolgt der Gasaustausch des Vogelembryos direkt mit der Außenwelt. Dazu genügt in den ersten Bebrütungstagen die O_2-Diffusion von den Schalenporen durch die Eimembranen zum Embryo. Die rasche Zunahme der Zellzahl erfordert dann die Bildung des Gefäßsystems der Chorioallantoismembran, das den Gasaustausch übernimmt. Das geschieht vom 5. bis zum 11. Bebrütungstag (24). Die innere Eischalenhaut ist dann zum großen Teil von der Chorioallantois bedeckt. Ihre weitere, langsame Ausbreitung ist noch bis zum 20. Bebrütungstag möglich.

Die Blutkapillaren liegen bis zum 10. Bebrütungstag unter dem zweischichtigen Chorionepithel und werden dann in dieses eingebaut. Der Einbau ist am 12. Bebrütungstag beendet. Damit verringert sich die Diffusionsstrecke zur Außenwelt von 4,3 µm auf unter 0,8 µm. Das Volumen der Kapillaren vergrößert sich bis zum 19. Bebrütungstag und nimmt dann zum Schlupf hin leicht ab. Von den ersten Bebrütungstagen abgesehen stellt die Chorioallantois für den Vogelembryo bis zum 19. Bebrütungstag die einzige Möglichkeit des Gasaustausches dar.

Beim Hühnerembryo beginnen ab dem 4. Bebrütungstag die Lungenknospen in den kraniodorsalen Teil der Pleuroperitonealhöhle hinein auszuwachsen (24). Dorsomedial wird Verbindung mit dem Mediastinum, ventral mit dem dorsalen Perikard aufgenommen. Aus dem entstandenen Primärbronchus sprießen dann drei Reihen Sekundärbronchen (Ventro-, Dorso- und Laterobronchen). Sie erreichen bald ihre endgültige Anzahl und Lage. Während der Aufzweigung der Sekundärbronchen entspringen aus Epithelknospen die ersten Parabronchen. Sie werden länger und erhalten ein Lumen. Auf diese Weise entläßt auch der Primärbronchus Parabronchen. In dieser Entwicklungsphase beginnen die Luftsäcke aus den dafür vorgesehenen Bronchen auszusprossen. Im kaudalen Lungenbereich vereinigen sich zahlreiche Parabronchen und nehmen Verbindung mit dem kaudalen Brust- und dem Bauchluftsack auf (Saccobronchen).

Noch zuvor - ab dem 8. Bebrütungstag - hat sich das Septum postpulmonale aus Teilen des Septum transversum entwickelt. Nach dem Verschluß des Septum postpulmonale verwächst die Lunge am Hilus beginnend mit diesem und dem dorsalen Perikard. Der Pleuralspalt besteht jetzt nur noch medial und dorsolateral. Die einsprießenden Luftsäcke spalten das Septum postpulmonale in das Septum horizontale und in das Septum obliquum auf, das zwischen den Luftsäcken und den Eingeweiden liegt. Nur der Bauchluftsack durchdringt das Septum postpulmonale. Die Pneumatisierung der Knochen erfolgt erst beim adulten Tier. Während des Wachstums der Luftsäcke heftet sich die Lunge von medial beginnend an der Brustwand an. Wenige Tage vor dem Schlupf besteht der Pleuralspalt nur noch aus kleinen, inselartigen Bezirken im dorsolateralen Bereich, die auch beim adulten Tier persistieren können.

Mit Beginn des letzten Drittels der Bebrütung haben die Parabronchen ihre endgültige Anzahl und Lage erreicht. Sie sind zunächst lange Röhren, die aus kubischem Epithel bestehen, das von zellreichem mesenchymalem Gewebe umgeben ist. Das Epithel bildet becherartige Aushöhlungen in das Mesenchym hinein, woraus später die Atria entstehen. Ringe oder Netze glatter Muskulatur entwickeln sich auf der Lumenseite der Parabronchen und begrenzen die Atria. Wenige Tage vor dem Schlupf ist im Mesenchym um die Parabronchen eine große Anzahl von Arteriolen vorhanden. Kleine Venen liegen am Grund der wachsenden Atria. In diesem Stadium wachsen die kapillären Verbindungen zwischen Arteriolen und Venolen sehr schnell. Ca. 2 - 3 Tage vor dem Schlupf ist die Amnionhöhle belüftet. Die bisher seltenen Atembewegungen werden regelmäßig und dienen der Belüftung des Bronchalsystems, der Luftsäcke und der Parabronchen. Das löst eine schnelle Weiterentwicklung der Auskleidung der Parabronchen aus. Die wenigen Arteriolen und Venolen werden länger und bilden eine dichte Kapillarschicht. Zur selben Zeit sprossen die Infundibula aus den Atria und geben eine große Anzahl von Luftkapillaren ab. Diese umgeben die entstehenden Blutkapillaren. Auf diese Weise bildet

sich ein dreidimensionales Netz, in dem sich der Gasaustausch vollzieht. Die aussprießenden Luftkapillaren sind mit Flüssigkeit gefüllt, die vor dem Beginn der Lungenatmung von den Blutkapillaren resorbiert wird. Die frisch entstandenen Luftkapillaren unterscheiden sich nicht von denen erwachsener Tiere. Der Feinbau der Vogellunge läßt erkennen, daß die Blut-Luftschranke sehr dünn ist. Dadurch ist eine sehr hohe Gasaustauschkapazität möglich, die für den hohen O_2-Verbrauch des Vogels erforderlich ist.

Mit der fortschreitenden Belüftung übernimmt die funktionsfähige Vogellunge mehr und mehr die bisherige Funktion der Chorioallantois, deren Anteil am Gasaustausch gleichzeitig sinkt (48). Diese "Zweigleisigkeit" der O_2-Versorgung vom ca. 19. Bebrütungstag an bis zum Schlupf ermöglicht es dem Vogel, sein Gasaustauschorgan schon vor dem Schlupf zu entfalten. Diese letzte Entwicklungsphase der Vogellunge verläuft also völlig anders als beim Säugetier, dessen terminale Luftwege nach der Geburt intensivem Wachstum und bedeutenden strukturellen Veränderungen unterliegen. Ein Hinweis auf die neonatale Weiterentwicklung der Säugetierlunge ist auch dadurch gegeben, daß nach künstlicher Verlängerung der Trächtigkeitsdauer beim Säugetier die Lungen retinierter Föten keine Veränderungen aufweisen (28).

4. Der Surfactant: Zusammensetzung, Aufgaben, Regulation der Synthese

VON NEERGAARD (75) berichtete schon 1929 über die Auswirkungen von Oberflächenkräften auf die Retraktionskraft der Lunge. Es wurde vermutet, daß die Retraktionskraft der luftgefüllten Lunge nicht nur auf elastischen Kräften des Gewebes beruht, sondern daß zusätzlich Oberflächenkräfte an der Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche eine Rolle spielen (62). In der Folge zeigten PATTLE (54) und CLEMENTS (16), daß sich in Lungenextrakten und in Lungenödemflüssigkeit ein die Oberflächenspannung reduzierender Faktor befindet.

Über die Zusammensetzung dieses Surfactant liegen eine Reihe von Arbeiten vor (14, 16, 41, 54, 55, 61, 62, 75). Danach besteht er zu ca. 75 - 80 % aus Phospholipiden, zu ca. 11 % aus Protein, zu ca. 8 % aus Cholesterin und aus verschiedenen, in geringen Mengen vorhandenen anderen Bestandteilen. Die Phospholipidfraktion besteht zu ca. 83 % aus Phosphatidylcholin, zu ca. 10 % aus Phosphatidylglycerol und zu ca. 7 % aus Phosphatidyläthanolamin. Die im Phosphatidylcholin am häufigsten vorkommende Fettsäure ist die Palmitinsäure (32). Überhaupt fällt auf, daß die im Phosphatidylcholin vorkommenden Fettsäuren in einem hohen Grade gesättigt sind, was offensichtlich eine Voraussetzung für die oberflächenaktive Wirkung des Surfactant ist (57). Das im Surfactant enthaltene Protein dient als Matrix (71).

Der Surfactant wird in Typ II - Zellen des Alveolarepithels gebildet. Diese treten gegen Ende der Embryonalzeit auf. Sie sind erkenntlich an "lamellären osmophilen Körperchen" (lamellated osmophilic bodies) im Zytoplasma. Diese Körperchen werden als Produktionsstätte für den Surfactant angesehen (7, 8, 45, 59, 60). Aus den Typ II - Zellen wird der Surfactant an die Oberfläche der Alveolen sezerniert. Er kleidet diese als Film aus und entwickelt seine die Oberflächenspannung reduzierenden Eigenschaften an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht. Zusätzlich zu seiner Aufgabe als "Anti-Atelektase-Faktor" vermindert der Surfactant den Druck, der nötig ist, die Lunge zu beatmen. Dies beruht darauf, daß durch den Surfactant die Oberflächenkräfte nach LA PLACE reduziert werden. Damit ist auch eine gleichmäßige Beatmung des Lungenparenchyms trotz unterschiedlicher Alveolengrößen möglich (2, 33, 72).

Die retraktiven Kräfte des luftgefüllten Lungengewebes beruhen zu zwei Dritteln auf der Oberflächenspannung und zu einem Drittel auf den elastischen Kräften des Bindegewebes (57). Dies läßt die Bedeutung des Surfactant besonders für die ersten Atemzüge des Neugeborenen erkennen. Eine ungenügende Ausbildung des Surfactant führt beim Neugeborenen zu Komplikationen bei der Entfaltung der Lunge. Die Ursachen für diese als "respiratory distress syndrome"

(RDS) bezeichnete Erkrankung sind noch nicht vollkommen geklärt. Es scheint aber eine Störung der neurohumoralen Regulation der Surfactantsynthese und -sekretion, die bis in die pränatale Entwicklungsphase zurückreicht, für das RDS verantwortlich zu sein. In diesem Zusammenhang wird der Hypophyse eine für die Lungenreifung entscheidende Bedeutung zugemessen (12, 13, 18, 44, 46). In zahlreichen Arbeiten konnte eine die Surfactantsynthese stimulierende Wirkung der Kortikosteroide aufgezeigt werden (5, 8, 29, 44, 59, 70). Dieser Effekt der Kortikosteroide wird heute beim RDS therapeutisch genutzt. Im Gegensatz dazu ist die Rolle des Thyroxins trotz der positiven Befunde von BALLARD (6) nicht vollständig geklärt. Die Surfactantsynthese und -sekretion wird außerdem durch den O_2-Partialdruck und das autonome Nervensystem reguliert (45, 47). In diesem Zusammenhang spielt auch die Lungendehnung eine Rolle (27). Daneben rücken das Renin-, Angiotensin- und das Kallikrein-Kinin-System immer stärker in den Vordergrund (4, 34, 47). Außerdem wird angenommen, daß auf dieser Stufe der Regulation der Surfactantsynthese die Prostaglandine Einfluß nehmen (5, 21, 37, 38, 43, 52, 57). Schließlich gibt es auch Hinweise darauf, daß bei der Regulation der Surfactantsynthese der Glukosestoffwechsel eine Rolle spielt (5, 19, 21, 50, 67).

Die bisher zitierten Quellen beziehen sich in der Regel auf die Verhältnisse in der Säugetierlunge. Über die Lungenreifung und den Surfactant beim Vogel liegen vergleichsweise wenige Arbeiten vor (18, 24, 46, 56). MILLER und BONDURANT (49) bestritten noch die Existenz eines Surfactant beim Vogel. Das Gegenteil kann aber inzwischen als gesichert gelten (24, 56). Beim Vogel tritt zum Zeitpunkt des Schlupfes zusätzlich zum Surfactant noch eine sogenannte "dreischichtige Substanz" (trilaminar substance, TLS) auf (56). Sie übertrifft mengenmäßig deutlich den Surfactant, der auch beim Vogel in den "lamellären, osmophilen Körperchen" gebildet wird. Es ist zu beachten, daß dem Vogel im Gegensatz zum Säugetier bei der Surfactantsynthese kein Glycogen zur Verfügung steht (46). Die Aufgaben des Surfactant beim Vogel sind

noch umstritten. Möglicherweise wirkt er wie beim Säugetier. Er soll aber auch antiexsudative bzw. hämostatische Eigenschaften haben und vor dem Einsetzen der Lungenatmung der Resorption der Flüssigkeit, die sich in den frisch entstandenen Luftkapillaren befindet, förderlich sein. Für die TLS werden ebenfalls verschiedene Funktionen diskutiert (24, 25, 56). Die Vorstellungen hierzu decken sich weitgehend mit den für den Surfactant geäußerten Möglichkeiten.

5. Synthese des Phosphatidylcholins

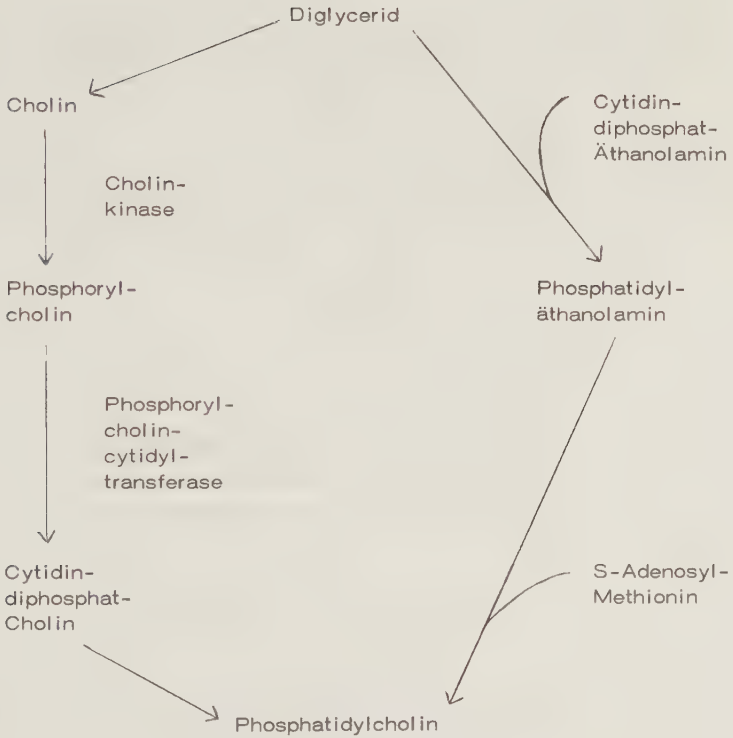
Phosphatidylcholin, der Hauptbestandteil des Surfactant, kann auf verschiedenen Wegen synthetisiert werden (39, 57). Dabei kann die De-novo-Synthese vom Diglycerid aus entweder über das Phosphatidyläthanolamin (Phosphatidyläthanolaminweg) oder aber über das CDP-Cholin (Cholinweg) erfolgen (s. Schema). Außer diesen beiden Wegen der De-novo-Synthese von Phosphatidylcholin kann nach Abspaltung einer Fettsäure durch die Phospholipase A_2 aus dem Phosphatidylcholin über das Lysophosphatidylcholin und die Lysophosphatidylcholinacyltransferase eine Resynthese erfolgen. Es ist zu beachten, daß auch Proteine an der Synthese von Phosphatidylcholin und anderen Phospholipiden beteiligt sind. So gibt es z. B. spezifische Transferproteine für die Phosphatidylcholin-, Phosphatidyläthanolamin- und Phosphatidylglycerolsynthese (74). UPRETI (73) verweist auf unterschiedliche Proteine als Katalysatoren bei der Phosphorylierung von Cholin und Äthanolamin.

6. Zielsetzung

Wie im allgemeinen Teil ausgeführt wurde, setzt beim Vogel im Gegensatz zum Säugetier die Atmung bereits in der pränatalen Entwicklungsphase ein. Dies erfordert eine ausgereifte Lunge zu diesem Entwicklungsstatus. Da - vor allem nach den Befunden beim Säugetier - die Lungenreifung unter dem Einfluß des Lipidstoffwechsels zu stehen scheint, wurde in dieser Arbeit der Lipidstoffwechsel um die Zeit der einsetzenden Lungenatmung studiert.

Aus anderen Arbeiten (11, 65) ist bekannt, daß der Schlupf des Vogels und die Entfaltung der Lunge durch die Applikation von L-Thyroxin beschleunigt und durch die Applikation von Thioharnstoff, einem Thyreostatikum, verlangsamt oder ganz unterdrückt werden kann. Diese Eingriffe in das Schlupfgeschehen bilden eine wichtige Grundlage für die Untersuchungen der Zusammenhänge zwischen Lungenreifung und pulmonalem Lipidstoffwechsel.

Schematische Darstellung der De-novo-Synthese von Phosphatidylcholin



II. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

1. Material und Methoden

a) Reagenzien und Chemikalien

Die in den Versuchen verwendeten Reagenzien und Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Enzyme, Coenzyme	Fa. Boehringer, Mannheim
Indomethazin, Cholinchlorid, DL-α-Phosphatidylcholin-Dipalmitoyl	Fa. Sigma, Taufkirchen
L-[Methyl-^{3}H] Methionin [Methyl-^{14}C] Cholinchlorid L-[U-^{14}C] Leucin	Fa. Amersham-Buchler, Braunschweig
Szintillationsflüssigkeit (Quick-Szint 212®)	Fa. Zinsser Analytic, Frankfurt/Main
Triton X	Fa. Serva, Heidelberg

L-Thyroxin und T_4-Antiserum wurden dankenswerter Weise von der Fa. Henning, Berlin, kostenlos zur Verfügung gestellt.
Alle übrigen Chemikalien lieferte die Fa. Merck, Darmstadt.

b) Bedingungen für die Versuchstiere

In den Versuchen wurden Küken der Rasse "Braunes Leghorn" verwendet. Die Eier wurden in einem Brutapparat bei 37° C und 63 - 67 % Luftfeuchtigkeit im Institut inkubiert. Nach dem Schlupf konnten die Küken handelsübliches Alleinfuttermittel und Wasser ad libitum aufnehmen. Die Applikation der eingesetzten Substanzen erfolgte am 17. Bebrütungstag. Nach der von WEISS (77) erprobten Methode wurden 2,5 mg Thioharnstoff in 0,25 ml H_2O oder

oder 0,006 mg L-Thyroxin in 0,1 ml H_2O oder 0,1 ml T_4-Antiserum vom Kaninchen (1:100 verdünnt) ins Ei appliziert. Für die Applikation der darüber hinaus eingesetzten Substanzen lagen keine Erfahrungswerte vor.

Es wurde eine Methode angewandt, die auch von anderen Autoren häufig benutzt wird, nämlich die Applikation in die Luftkammer. Durch Schieren der Eier wurde die Lage der Luftkammer bestimmt. In diese wurde die betreffende Substanz hineinappliziert. Anschließend wurde die Injektionsstelle mit Klebstoff (Uhu®) verschlossen, und die Eier wurden für ca. 8 h auf die Spitze gestellt. Dadurch sollte eine schnelle Resorption durch die in der Luftkammermembran verlaufenden Gefäße gewährleistet werden. Auf diese Weise wurden appliziert: 0,0125 mg Dexamethason in 0,05 ml Äthanol-H_2O-Gemisch (1:1) oder 2 mg Indomethazin in 0,1 ml H_2O. Die angegebene Dosis von T_4-Antiserum, Dexamethason bzw. Indomethazin erhöhte die Mortalitätsrate nicht nennenswert. Dies wurde anhand von Vorversuchen ermittelt.

c) Bestimmungen aus dem Lungenlyophilisat

- Herstellung des Lyophilisates

  Den Tieren wurde sofort nach dem Töten die Lunge entnommen, bei - 20° C eingefroren und anschließend lyophilisiert. Nach dem Lyophilisieren (24 h) wurden die Lungen im Exsikkator aufbewahrt.

- Bestimmung des Hämoglobingehaltes

  Diese Bestimmung sollte einen Hinweis auf das Ausmaß der Durchblutung der Kükenlunge liefern. Um herauszufinden, ob die Extinktionserhöhung im Versuchsansatz tatsächlich durch Hämoglobin hervorgerufen wurde, wurden die Absorptionsmaxima

des Versuchsansatzes bestimmt. Diese stimmten mit den bekannten Absorptionsmaxima des Hämoglobins überein. Für die Hämoglobinbestimmung (10) wurden 50 mg lyophilisierte Lunge mit 6 ml Triäthanolamin (TÄA)-Puffer (0,057 mol/l, pH 7,6) versetzt, mit dem Ultraturrax (TP 18/2, Fa. Janke und Kunkel, Staufen i. Br.) zerkleinert und 10 Minuten lang bei 3000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig in ein graduiertes Reagenzglas dekantiert. Der Niederschlag wurde mit 4 ml TÄA-Puffer versetzt, aufgewirbelt und erneut wie oben zentrifugiert. Die Überstände wurden vereinigt. Die Gesamtmenge wurde mit TÄA-Puffer auf 10 ml ergänzt. Davon wurden 0,2 ml mit 2 ml Hämoglobinreagenzlösung, bestehend aus K_3 [Fe (CN)$_6$] (0,6 mmol/l), KCN (0,7 mmol/l) und KH_2PO_4 (1,0 mmol/l), versetzt. Eine vor der Messung bestehende Trübung wurde beseitigt, indem das Reaktionsgemisch durch Celite® zentrifugiert wurde. Die Intensität der Rotfärbung des Gemisches wurde photometrisch bei Hg 546 nm gemessen.

- Bestimmung der Lungenlipide

Zur Inaktivierung der Enzyme wurden 50 mg Lyophilisat 10 Minuten lang auf 98 - 100° C erhitzt. Anschließend wurden 5 ml Methanol-Chloroform-Gemisch (1:2) zugefügt. Die Probe wurde mit dem Ultraturrax zerkleinert und lipoide Substanzen nach FOLCH (31) extrahiert. Ein Teil der organischen Phase wurde bei 60° C im Vakuum vollständig eingedampft. Der Rückstand wurde in 1,0 ml Isopropanol aufgenommen. Isopropanol verursachte im Gegensatz zu anderen organischen Lösungsmitteln wie Chloroform, Hexan oder Dioxan, die in diesem Zusammenhang ausprobiert worden waren, keine Trübung im Reaktionsansatz. Von dem gelösten Rückstand wurden aliquote Mengen zur Bestimmung des Triglyceridgehaltes, des Cholesteringehaltes und des Phosphatidylcholingehaltes eingesetzt.

Der Triglyceridgehalt wurde nach der Methode von WAHLEFELD (76) bestimmt. Diese beruht auf der enzymatischen Bestimmung

des Glycerins, das enzymatisch aus dem Triglycerid abgespalten wird. Bei der anschließenden Phosphorylierung des Glycerins durch die Glycerokinase fällt ADP an. Dieses wird über die Reaktionen der Pyruvatkinase in ADP übergeführt, wobei gleichzeitig Pyruvat entsteht. Dieses wird quantitativ bestimmt.

Der Cholesteringehalt wurde nach RÖSCHLAU et al. (64) bestimmt. Der Bestimmung liegt folgendes Prinzip zugrunde: bei der Oxidation des Cholesterins entsteht als Meßgröße H_2O_2. Dieses wird zusammen mit Methanol über die Reaktion der Katalase zu Formaldehyd und H_2O umgesetzt. Formaldehyd wiederum bildet zusammen mit Acetylaceton und Ammoniak einen gelben Farbkomplex, dessen Intensität photometrisch bei Hg 405 nm gemessen wird. Mit dieser Methode wird sowohl das freie als auch das veresterte Cholesterin erfaßt.

Die Bestimmung des Phosphatidylcholingehaltes erfolgte nach der Methode von DIEDRICH et al. (23). Sie beruht auf folgendem Prinzip: Phosphatidylcholin wird durch die zugegebene Phospholipase C in Diglycerid und Phosphorylcholin gespalten. Vom entstandenen Phosphorylcholin wird durch die alkalische Phosphatase der Phosphatrest abgetrennt. Die Reaktion wird durch Kochen gestoppt und anschließend wird das entstandene Cholin bestimmt. Dabei wird es unter Zusatz von ATP von der Cholinkinase phosphoryliert. Über das anfallende ADP wird Phosphoenolpyruvat durch die Pyruvatkinase in Pyruvat übergeführt, das dann über die Reaktion der Lactatdehydrogenase quantitativ erfaßt wird.

- Bestimmung des DNS-Gehaltes

Sie wurde nach einer Methode von BURTON (15) durchgeführt. Diese beruht auf der Bildung eines Farbkomplexes der Desoxyribose mit Diphenylamin, dessen Extinktion bei Hg 546 nm gemessen wurde.

d) Bestimmung der Lipide im Serum

Das Blut von Embryonen und geschlüpften Küken (bis zu 3 Tagen alt) wurde durch Herzpunktion gewonnen. Als Gerinnungshemmer wurde Heparin (Liquemin®) zugegeben. Das Blut wurde 10 Minuten lang bei 2000 x g zentrifugiert. Vom Überstand wurden aliquote Mengen zur Bestimmung des Gehaltes an Triglyceriden, Cholesterin und Phosphatidylcholin eingesetzt. Die Bestimmungen der Lipide erfolgte nach den oben beschriebenen Methoden.

e) Bestimmung des Einbaus von [Methyl-^{14}C] Cholinchlorid und L-[Methyl-^{3}H] Methionin in Phosphatidylcholin

Die Bestimmung des Surfactant erfolgt beim Säugetier in der Regel in der Waschflüssigkeit, mit der die Lunge ausgespült wird (78). Eigene Vorversuche beim Küken zeigten aber, daß hier die Rückgewinnung intratracheal applizierter Flüssigkeit nicht möglich ist. Durch Versuche mit gefärbter Waschflüssigkeit konnte festgestellt werden, daß diese in die Luftsäcke abfloß. Von dort konnte sie nicht mehr vollständig zurückgewonnen werden. Um dennoch zu einer Aussage über den Surfactant zu kommen, wurde die Syntheserate des Phosphatidylcholins gemessen. Das Phosphatidylcholin stellt den Hauptbestandteil des Surfactant dar. Wie im "Allgemeinen Teil" beschrieben wurde, kann seine De-novo-Synthese auf zwei verschiedenen Wegen, die über die Messung der Syntheserate von Phosphatidylcholin aus [Methyl-^{14}C] Cholin und L-[Methyl-^{3}H] Methionin erfaßt werden, erfolgen. Für die Bestimmung wurde die Methode nach COMPTON und GOERINGER (17) angewandt.

Sofort nach dem Töten der Versuchstiere wurden die Lungen entnommen. Diese wurden in kleine Stückchen von maximal

1 mm Schichtdicke zerteilt und in eiskaltem Krebs-Henseleit-Puffer, der 2 mg Glucose pro 1 ml enthielt, bis zur Inkubation aufbewahrt. Jeder Ansatz enthielt ca. 300 mg Lungengewebe. Die Proben wurden mit O_2 begast und anschließend wurden die Reaktionsgefäße fest verschlossen. Nach einer 10-minütigen Vorinkubation bei 37° C im Schüttelbad wurden je Ansatz 0,2 µCi [Methyl-^{14}C] Cholinchlorid oder 2 µCi L-[Methyl-^{3}H] Methionin zugegeben, die Proben erneut begast und 1 h lang inkubiert. Die Linearität der Einbaurate der radioaktiv markierten Metaboliten für diesen Zeitraum war in Vorversuchen festgestellt worden. Die Reaktion wurde im Eisbad gestoppt. Dann wurden die Proben in der Kühlzentrifuge bei 2 - 4° C und 10000 x g 10 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Der Niederschlag wurde in 5 ml Methanol-Chloroform-Gemisch (1:2) mit dem Ultraturrax zerkleinert und nach FOLCH (31) extrahiert. Nach der Phasentrennung wurde die organische Phase abpipettiert. Die anorganische Phase wurde mit 1 ml Methanol-Chloroform-Gemisch (1:2) nachgewaschen und davon die organische Phase mit der vorher gewonnenen vereinigt. Anschließend wurde die organische Phase bei 60° C im Vakuum vollständig eingedampft. Der Rückstand wurde in 0,3 ml Isopropanol aufgenommen und auf eine Dünnschichtchromatographieplatte aufgetragen. Als Fließmittel wurde eine Methanol-Chloroform-Wasser-Mischung (30:70:5) benutzt. War die Fließmittelgrenze ca. 16 cm weit gewandert, wurde die Platte 3 Minuten lang bei 105° C im Trockenschrank getrocknet, mit Rhodamin B-Spray eingefärbt und erneut getrocknet. Durch mitlaufendes DL-α-Dipalmityl-Phosphatidylcholin wurde der Phosphatidylcholinfleck ermittelt. Er wurde ausgekratzt und in einem Packard-Gefäß mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit (Quick-Szint 212®) versetzt. Anschließend wurde die Radioaktivität in der Szintillationsflüssigkeit gemessen.

Die gemessene Radioaktivität wurde auf das Trockengewicht der Lungenschnitte, die sich nach der Extraktion in der anor-

ganischen Phase anreicherten, bezogen. Dazu wurden diese über ein Filter abgesaugt und die im Filter verbliebenen Schnitte 2 h lang bei 105° C im Trockenschrank getrocknet. Nach dem Abkühlen im Exsikkator wurden sie gewogen.

f) Bestimmung des Einbaus von L- [U-^{14}C] Leucin in das Lungenprotein

Diese Bestimmung wurde modifiziert nach DICKIE et al. (22) durchgeführt. Dabei wurden ca. 200 mg Lungenschnitte in 2 ml Krebs-Henseleit-Puffer, der 2 mg Glukose pro 1 ml enthielt, eingesetzt. Die Inkubationsdauer betrug 2 h. Es wurden 0,1 µ Ci L- [U-^{14}C] Leucin eingesetzt. Auch hier wurde in Vorversuchen die Linearität der Einbaurate für diesen Zeitraum ermittelt. Die Versuchsbedingungen glichen denen der oben beschriebenen In-vitro-Versuche zum Einbau radioaktiv markierter Metaboliten. Nach der Inkubation wurden die Proben eisgekühlt gepottert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zusatz von 5 ml $HClO_4$ (2 mol/l) gestoppt. Die Homogenisierung der Schnitte war erleichtert, wenn sie vor der Zugabe der $HClO_4$ erfolgte. Danach wurden die Proben 10 Minuten lang bei 5000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Niederschlag zweimal mit $HClO_4$ (1 mol/l) nachgewaschen. Anschließend wurden lipophile Substanzen durch Waschen mit 5 ml Äther-Äthanol-Gemisch (1:1) entfernt. Nun wurde der Niederschlag in 6 ml Triton X (1 %) aufgenommen. Die Proben wurden dann 30 Sekunden lang mit Ultraschall homogenisiert. Diese Behandlung wurde wiederholt. Aus den nun homogenen Proben wurden aliquote Mengen zur Bestimmung der Radioaktivität entnommen. Dazu wurden jeweils 10 ml Szintillationsflüssigkeit (Quick-Szint 212®) zugegeben. Die Messung der Radioaktivität erfolgte im Flüssigkeitsszintillationszähler. Ein weiteres Aliquot wurde zur Proteinbestimmung entommen.

Diese wurde mit Biuret-Reagenz durchgeführt. Die Messung des entstandenen Farbkomplexes erfolgte photometrisch bei Hg 546 nm.

g) Bestimmung des O_2-Verbrauchs der embryonalen Küken

Der O_2-Verbrauch wurde in einem modifizierten SCHOLANDER-Respirometer gemessen (68). Die Inkubationskammer, die ein bebrütetes Ei und 20 %ige KOH zur Absorption des vom Embryo produzierten CO_2 enthielt, stand über ein U-Rohr mit einer Ausgleichskammer in Verbindung. Dieses System wurde im Wasserbad auf Bebrütungstemperatur gehalten. Zu Beginn der Messung wurde die Inkubationskammer mit O_2 begast und dann mit einer O_2-gefüllten Spritze verschlossen. Der O_2-Verbrauch des Embryos reduzierte den Gasdruck in der Inkubationskammer. Die dadurch bedingte Abweichung des Flüssigkeitsspiegels im Manometer wurde durch die Injektion von O_2 aus der Spritze ausgeglichen. Das injizierte Volumen wurde an der Kalibrierung der Spritze abgelesen. Es entspricht dem Verbrauch an O_2 im beobachteten Zeitraum.

h) Messung des Glucoseumsatzes in Lungenschnitten

Die Untersuchungen wurden an Lungenschnitten durchgeführt. Die Inkubation und Aufarbeitung erfolgte nach dem gleichen Verfahren, wie es im Abschnitt 1. f) beschrieben wurde. Anstelle von radioaktivem Leucin wurden die Schnitte mit Glucose (10 mmol/l) versetzt. Die Glucose- und die Lactatkonzentration wurden zum Zeitpunkt 0 und nach 60 min bestimmt. Die Glucosekonzentration wurde nach der Methode von BERGMEYER et al. (9), die Lactatkonzentration nach der Methode von HOHORST (35) gemessen.

i) Statistische Auswertung

Die in den Tabellen angegebenen Werte stellen Mittelwerte dar. Zusätzlich wird die Standardabweichung angegeben. Die statistische Auswertung der erzielten Unterschiede wurde mittels des Student's t-Tests durchgeführt (66).
Die Anzahl der Proben wird in Klammern angegeben.

2. Ergebnisse

a) Die Auswirkungen der applizierten Substanzen auf den Schlupf und die Atmung

Zunächst war zu überprüfen, inwieweit die eingesetzten Substanzen unter den gegebenen Bedingungen Auswirkungen auf den Schlupf und den Beginn der Lungenatmung zur Folge haben. Aus anderen Arbeiten war bekannt, daß T_4 den Schlupf (und den Beginn der Lungenatmung) um ca. 24 h beschleunigt und daß Thioharnstoff diese Vorgänge entweder verlangsamt oder ganz unterdrückt. Dies konnte in den durchgeführten Versuchen bestätigt werden.

Die mit Thioharnstoff behandelten Küken schlüpften nicht mehr aus dem Ei, wenn sie dieses nicht spätestens 48 h nach dem regulären Schlupfzeitpunkt angepickt hatten. Alle übrigen eingesetzten Substanzen (T_4-Antiserum, Dexamethason und Indomethazin) hatten keine Auswirkungen auf den Zeitpunkt des Schlupfes.

Die Lungenatmung wurde anhand des O_2-Verbrauchs überprüft (Tab. 1). Bekanntlich hat das Einsetzen der Lugenatmung

Tabelle 1

Der Einfluß applizierter Substanzen
auf den O_2-Verbrauch der embryonalen Küken

Bebrütungsdauer (Tage)	18	19	20	21	postnatal 2 - 3 Tage
			O_2 cm^3/h		
Kontrolle	18,9(6) ± 2,2	21,4(10) ± 1,7	24,3(6) ± 4,8	33,6(9) ± 5,3	
Thioharnstoff		22,7(12) ± 5,6		21,2(13)$^{+++}$ ± 2,3	30,1(12)^{x} ± 2,3
L-Thyroxin		25,6(10) ± 3,7	33,8(10)$^{+++}$ ± 3,2		
T_4-Antiserum	18,9(6) ± 1,7	20,3(6) ± 3,2	26,0(8) ± 4,1	29,1(4) ± 4,7	
Indomethazin	17,9(6) ± 4,6	22,7(14) ± 2,5	28,3(13) ± 5,9	34,3(3) ± 12,1	
Dexamethason		22,1(8) ± 2,5	25,9(3) ± 3,9		

+++ : $p \leq 0,001$ verglichen mit gleichaltrigen Kontrollen

x Eischale angepickt

einen deutlichen Anstieg des O_2-Verbrauchs zur Folge. Wie bei den Untersuchungen von KUGLER (42) wurde auch in diesen Versuchen der Beginn der Lungenatmung durch T_4 beschleunigt und durch Thioharnstoff verzögert bzw. unterdrückt. Die übrigen Substanzen hatten auf die Lungenatmung keinen Einfluß.

b) Lipide in der lyophilisierten Kükenlunge

Der Triglyceridgehalt der Lungen (Tab. 2) zeigte in der Kontrollgruppe folgenden Verlauf: in der pränatalen Phase wies die Lunge einen annähernd konstanten Triglyceridgehalt auf. Erst am 2./3. Tag nach dem Schlupf kam es zu einem signifikanten Abfall. Die Lungen der T_4-behandelten Embryonen wiesen am 19. Bebrütungstag einen gegenüber den Kontrolltieren deutlich erhöhten und am 20. Bebrütungstag einen deutlich erniedrigten Triglyceridgehalt auf. In der neonatalen Phase kam es im Gegensatz zu den unbehandelten Tieren zu keinem weiteren Abfall der Triglyceridkonzentration.

Unter dem Einfluß von Thioharnstoff war pränatal keine Veränderung gegenüber der Kontrollgruppe feststellbar. In der neonatalen Phase zeichnet sich die Lunge der mit Thioharnstoff behandelten Küken durch eine besonders hohe Triglyceridkonzentration aus. Die Applikation von T_4-Antiserum hat in der pränatalen Phase keine Auswirkungen auf den Triglyceridgehalt. In der neonatalen Entwicklungsphase verhinderte T_4-Antiserum offensichtlich den Abfall der Triglyceridkonzentration.

Der Cholesteringehalt des Lungenlyophilisates (Tab. 3) stieg bei den Kontrolltieren vom 19. Bebrütungstag an bis in die postnatale Phase hinein an. Unter dem Einfluß von L-Thyroxin war der Anstieg der Cholesterinkonzentration am 19. Bebrütungstag besonders deutlich ausgeprägt. Bei den mit Thioharn-

Tabelle 2

Der Einfluß applizierter Substanzen

auf den Triglyceridgehalt der lyophilisierten Kükenlunge

Bebrütungsdauer (Tage)	17/18	19	20	21	postnatal 2 - 3 Tage
		Triglyceride µmol/g			
Kontrolle	10,99(9) ± 2,43	10,43(6) ± 1,75	10,05(6) ± 1,74	11,80(6) ± 1,81	6,10(7(± 1,45
L-Thyroxin		13,22(9)$^{++}$ ± 0,89	6,16(6)$^{++}$ ± 1,69		5,19(6) ± 0,78
Thioharnstoff		9,60(6) ± 3,12	8,35(6) ± 2,95	9,90(6) ± 3,72	22,77(6)$^{+++}$x ± 3,75
T_4-Antiserum			11,53(7) ± 3,04	12,75(6) ± 3,14	11,52(6)$^{+++}$ ± 1,43

$^{++}$: $p \leq 0,01$ } verglichen mit gleichaltrigen Kontrollen

$^{+++}$: $p \leq 0,001$ }

x Eischale angepickt

Tabelle 3

Der Einfluß applizierter Substanzen
auf den Cholesteringehalt der lyophilisierten Kükenlunge

Bebrütungsdauer (Tage)	17/18	19	20	21	postnatal 2 - 3 Tage
		Cholesterin µmol/mg			
Kontrolle	37,4(13) ± 6,2	37,5(7) ± 8,5	49,7(7) ± 13,2	51,2(6) ± 10,2	60,2(6) ± 5,8
L-Thyroxin		51,7(9)$^{++}$ ± 7,2	57,4(6) ± 2,5		60,0(6) ± 7,5
Thioharnstoff		38,5(6) ± 12,8	70,2(6)$^{+}$ ± 12,6	63,0(6) ± 10,6	64,5(6) × ± 7,0
T_4-Antiserum			69,4(7)$^{+}$ ± 11,5		73,2(6)$^{++}$ ± 6,7

$^{+}$: $p \leq 0,05$ } verglichen mit gleichaltrigen Kontrollen
$^{++}$: $p \leq 0,01$ }

× Eischale angepickt

stoff bzw. T_4-Antiserum behandelten Tieren lag der Cholesteringehalt der Lungen im Durchschnitt über dem der Kontrollgruppe.

Im Verlauf der perinatalen Entwicklung trat bei den Kontrolltieren keine Veränderung der Phosphatidylcholinkonzentration in der lyophilisierten Lunge ein (Tab. 4). Die Applikation von L-Thyroxin führte in der pränatalen Phase zu keiner signifikanten Veränderung des Phosphatidylcholingehaltes. Dagegen war dieser unter dem Einfluß von Thioharnstoff bzw. T_4-Antiserum in der pränatalen Phase erhöht. In der postnatalen Phase wiesen die Lungen der Tiere der L-Thyroxin- und der Thioharnstoffgruppe einen signifikant erniedrigten Phosphatidylcholingehalt bezogen auf die Lungen der Kontrolltiere auf.

c) In-vitro-Versuche über die Phosphatidylcholinsynthese

Wie aus Tab. 4 ersichtlich ist, hatte die Applikation von Thioharnstoff bzw. T_4-Antiserum in der pränatalen Phase eine bezogen auf die Kontrolltiere erhöhte Phosphatidylcholinkonzentration zur Folge. Hingegen hatte L-Thyroxin keinen Einfluß auf den Phosphatidylcholingehalt, obgleich bekannt ist, daß Schilddrüsenhormone die Phospholipidsynthese in der Lunge stimulieren.

Es wurde daher in den folgenden Versuchen die Phosphatidylcholinsynthese in der Lunge eingehender studiert. Dabei wurden Lungenschnitte von Embryonen, die mit L-Thyroxin, Thioharnstoff bzw. T_4-Antiserum behandelt worden waren, mit [Methyl-^{14}C] Cholinchlorid bzw. L-[Methyl-^{3}H] Methionin inkubiert. Anschließend wurde der radioaktive Einbau in die Phospholipidfraktion gemessen.
Die Ergebnisse sind in Tab. 5, 6 wiedergegeben.

Tabelle 4

Der Einfluß applizierter Substanzen
auf den Phosphatidylcholingehalt der lyophilisierten Kükenlunge

Bebrütungsdauer (Tage)	17/18	19	20	21	postnatal 2 - 3 Tage
			Phosphatidylcholin mmol/mg		
Kontrolle	0,107(12) ± 0,012	0,100(6) ± 0,048	0,113(6) ± 0,030	0,100(8) ± 0,015	0,117(9) ± 0,016
L-Thyroxin		0,091(6) ± 0,009			$0,087(6)^{++}$ ± 0,012
Thioharnstoff		0,136(4) ± 0,022	$0,155(6)^{+}$ ± 0,027	$0,151(8)^{++}$ ± 0,036	$0,091(10)^{++}$x ± 0,021
T_4-Antiserum			$0,147(9)^{+}$ ± 0,031	$0,147(6)^{+++}$ ± 0,020	0,112(6) ± 0,017

$^{+}$: $p \leq 0,05$
$^{++}$: $p \leq 0,01$
$^{+++}$: $p \leq 0,001$
} verglichen mit gleichaltrigen Kontrollen

x Eischale angepickt

Danach (Tab. 5) wiesen die Lungenschnitte der Kontrolltiere am 19. und 20. Bebrütungstag eine konstante Syntheserate auf. Am 2. - 3. Lebenstag war diese jedoch signifikant verringert. Unter dem Einfluß von L-Thyroxin war am 20. Bebrütungstag ein Anstieg der Syntheserate feststellbar. Die Applikation von Thioharnstoff bzw. T_4-Antiserum hatte eine verringerte Syntheserate am 20. Bebrütungstag und eine erhöhte Syntheserate in der neonatalen Phase zur Folge.

Zum weiteren Studium der Beeinflußbarkeit der Phosphatidylcholinsynthese auf dem Cholinweg wurden noch Dexamethason und Indomethazin eingesetzt. Dabei konnte am 19. Bebrütungstag eine Stimulierung der Phosphatidylcholinsynthese beobachtet werden. Die Applikation von Indomethazin, das seine Wirkung über eine Hemmung der Prostaglandinsynthese entfalten soll, hatte ebenso wie die Applikation von Thioharnstoff bzw. T_4-Antiserum eine verringerte Phosphatidylcholinsynthese zur Folge.

Die Synthese von Phosphatidylcholin aus L- [Methyl-^{3}H] - Methionin verhielt sich wie folgt (Tab. 6): die Syntheserate in der Kontrollgruppe fiel vom 19. zum 21. Bebrütungstag signifikant ab. Unter dem Einfluß von L-Thyroxin war die Phosphatidylcholinsynthese auf dem Phosphatidyläthanolaminweg am 19. Bebrütungstag schon deutlich erniedrigt, stieg aber im Gegensatz zu den Verhältnissen in der Kontrollgruppe am 20. Bebrütungstag an. Bei den mit Thioharnstoff bzw. T_4-Antiserum behandelten Tieren war der Abfall der Syntheserate vom 19. zum 20. Bebrütungstag deutlich verzögert.

Tabelle 5

Der Einfluß applizierter Substanzen

auf die Einbaurate von [Methyl-^{14}C] Cholinchlorid in Phosphatidylcholin von Lungenschnitten

Bebrütungsdauer (Tage)	19	20	postnatal 2 - 3 Tage
	IPM/mg Trockengewicht		
Kontrolle	1023,7(6) ± 307,7	1146,2(7) ± 200,1	599,5(6) ± 163,0
L-Thyroxin	761,2(6) ± 219,5	1516,4(6)$^{+}$ ± 335,3	797,0(6) ± 151,8
Thioharnstoff	742,7(7) ± 152,7	572,6(7)$^{+++}$ ± 101,4	1108,2(6)$^{+}$ x ± 416,5
T_4-Antiserum	665,7(6)$^{+}$ ± 178,7	484,4(6)$^{+++}$ ± 131,4	1058,0(6)$^{+++}$ ± 167,1
Dexamethason	2370,0(6)$^{+++}$ ± 478,7	1144,7(6) ± 163,5	923,9(6)$^{++}$ ± 175,2
Indomethazin	820,2(6) ± 158,0	722,4(10)$^{+++}$ ± 122,0	886,2(6)$^{++}$ ± 189,4

$^{+}$: $p \leq 0,05$
$^{++}$: $p \leq 0,01$
$^{+++}$: $p \leq 0,001$
} verglichen mit gleichaltrigen Kontrollen

x Eischale angepickt

Tabelle 6 Der Einfluß applizierter Substanzen

auf die Einbaurate von L- Methyl-^{3}H Methionin in Phosphatidylcholin von Lungenschnitten

Bebrütungsdauer (Tage)	19	20	21
	IPM/10 mg Trockengewicht		
Kontrolle	3530,2(6) ± 820,3	921,5(6) ± 322,4	670,0(6) ± 209,6
L-Thyroxin	1234,5(6)$^{+++}$ ± 529,3	1819,1(6)$^{+++}$ ± 301,6	
Thioharnstoff	4172,8(6) ± 1204,3	1559,7(6)$^{++}$ ± 346,2	
T_4-Antiserum	4400,8(6) ± 1468,2	2174,1(6)$^{++}$ ± 712,7	

$^{++}$: $p \leq 0,01$
$^{+++}$: $p \leq 0,001$
} verglichen mit gleichaltrigen Kontrollen

d) Serumspiegel von Triglyceriden, Cholesterin und Phosphatidylcholin

In der hier untersuchten Entwicklungsphase bezieht der Kükenembryo seine Energie in der Hauptsache aus Lipidvorräten im Ei, die ihm über das Blut zugeführt werden. Im Zusammenhang mit dem Lipidstoffwechsel der Lunge war deswegen von Interesse, inwieweit Veränderungen der Lipidkonzentration in der Lunge in den entsprechenden Serumwerten repräsentiert sind. Daher wurden in der Folge die Serumwerte von Triglyceriden, Cholesterin und Phosphatidylcholin bestimmt.

Die Triglyceridwerte im Serum verhielten sich wie folgt (Tab. 7): in der Kontrollgruppe zeigte sich pränatal keine Veränderung und postnatal ein deutlicher Abfall. Unter dem Einfluß von L-Thyroxin waren die Serumwerte am 19. Bebrütungstag signifikant erhöht, zeigten aber am 20. Bebrütungstag und postnatal keine Veränderungen gegenüber denjenigen der Kontrolltiere. Bei den mit Thioharnstoff behandelten Tieren war der Triglycerid-Serumspiegel in der neonatalen Phase deutlich höher als bei den Kontrollen.

Beim Cholesterin-Serumspiegel (Tab. 8) war perinatal ein mit der Entwicklung einhergehender signifikanter Anstieg feststellbar. Dies gilt für alle drei Versuchsgruppen. Die behandelten Tiere wiesen jedoch in der pränatalen Phase gegenüber den Kontrolltieren erhöhte Serumwerte auf.

Der Phosphatidylcholin-Serumspiegel (Tab. 9) der Kontrolltiere wies in der pränatalen Phase keine Veränderungen auf. Der postnatale Wert lag jedoch deutlich unter dem der Embryonen. Auch bei den Tieren der L-Thyroxingruppe ergaben sich in der pränatalen Phase keine unterschiedlichen Phosphatidylcholin-Serumwerte bezogen auf die Kontrolltiere. Postnatal lag hier jedoch ein deutlich erhöhter Serumspiegel vor. Dies gilt auch für die thioharnstoffbehandelten Tiere.

Tabelle 7

Der Einfluß applizierter Substanzen

auf den Triglycerid-Serumspiegel

Bebrütungsdauer (Tage)	19	20	postnatal 2 - 3 Tage
	Triglyceride mmol/l		
Kontrolle	3,06(6) ± 0,21	3,10(6) ± 0,28	2,10(6) ± 0,45
L-Thyroxin	4,69(6)$^{+++}$ ± 0,67	2,76(6) ± 0,64	2,28(6) ± 0,29
Thioharnstoff	2,79(9) ± 0,43	3,35(9) ± 0,56	3,22(9)$^{++}$ x ± 0,66

$^{++}$: $p \leq 0,01$ } verglichen mit gleichaltrigen Kontrollen

$^{+++}$: $p \leq 0,001$ }

x Eischale angepickt

Tabelle 8

Der Einfluß applizierter Substanzen

auf den Cholesterin-Serumspiegel

Bebrütungsdauer (Tage)	19	20	postnatal 2 - 3 Tage
	Cholesterin mmol/l		
Kontrolle	4,95(6) ± 0,27	5,88(6) ± 0,94	8,99(6) ± 1,18
L-Thyroxin	6,19(6)$^{+++}$ ± 0,53	9,50(6)$^{+++}$ ± 0,82	9,53(6) ± 1,45
Thioharnstoff	5,84(6)$^{++}$ ± 0,58	7,78(6)$^{++}$ ± 0,60	7,79(6) × ± 0,99

$^{++}$: $p \leq 0,01$ } verglichen mit gleichaltrigen Kontrollen

$^{+++}$: $p \leq 0,001$ }

× Eischale angepickt

Tabelle 9

Der Einfluß applizierter Substanzen

auf den Phosphatidylcholin-Serumspiegel

Bebrütungsdauer (Tage)	19	20	postnatal 2 - 3 Tage
	Phosphatidylcholin mmol/l		
Kontrolle	8,75(9) ± 0,83	7,73(9) ± 0,86	5,58(6) ± 0,54
L-Thyroxin	6,98(6) ± 0,85	6,89(6) ± 1,12	$8,29(6)^{+}$ ± 1,85
Thioharnstoff	6,85(9) ± 1,85	7,25(9) ± 1,35	$6,80(6)^{++}$ x ± 0,66

$^{+}$: $p \leq 0,05$ } verglichen mit gleichaltrigen Kontrollen

$^{++}$: $p \leq 0,01$ }

x Eischale angepickt

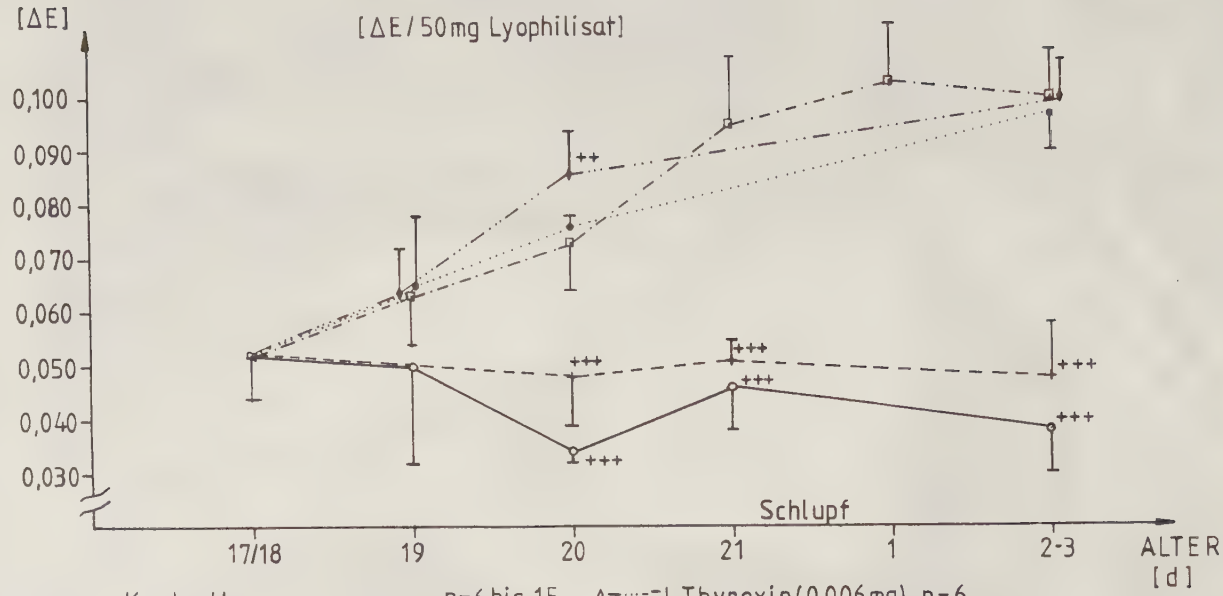
e) Hämoglobingehalt der lyophilisierten Kükenlungen

Da sich die Lungen der mit Thioharnstoff bzw. T_4-Antiserum behandelten Tiere bei der Entnahme als auffallend blaß und wäßrig erwiesen, wurde der Hämoglobingehalt als Maß für die Durchblutung der Lungen bestimmt (Fig. 1). Bei den Tieren der Kontrollgruppe lief dabei folgende Entwicklung ab: vom 17./18. bis zum 20. Bebrütungstag kam es zu einem kontinuierlichen Anstieg des Hämoglobingehaltes. Der Anstieg war vom 20. bis 21. Bebrütungstag steiler. Damit war dann auch der postnatale Wert erreicht. Die Applikation von L-Thyroxin bewirkte schon vom 19. zum 20. Bebrütungstag einen signifikanten Anstieg der Hämoglobinkonzentration in der Lunge. Postnatal war kein Unterschied zur Kontrollgruppe feststellbar. Unter dem Einfluß von Thioharnstoff bzw. T_4-Antiserum war kein Anstieg des Hämoglobingehaltes zu beobachten. Allerdings war der Hämoglobingehalt in der T_4-Antiserumgruppe im Durchschnitt etwas höher als derjenige in der Thioharnstoffgruppe. Unter dem Einfluß von Indomethazin zeigten sich hinsichtlich des Hämoglobingehaltes der Lungen keine Unterschiede gegenüber den Kontrolltieren.

Ergänzend wurden Lungenschnitte einiger Tiere elektronenmikroskopisch untersucht. Bei dem in Abb. a abgebildeten Präparat handelt es sich um die Lunge eines mit Thioharnstoff behandelten Tieres vom 23. Bebrütungstag, das noch nicht in der Luftkammer und dessen Lunge noch nicht beatmet war. Hierbei fällt besonders auf, daß die Luftkapillaren mit Flüssigkeit gefüllt sind. Demgegenüber waren die Luftkapillaren von unbehandelten Embryonen, deren Lungenatmung bereits am 20. Tag der Bebrütung einsetzte, weitgehend frei von Flüssigkeit (Abb. b).

FIGUR 1

Hämoglobingehalt der Kükenlunge

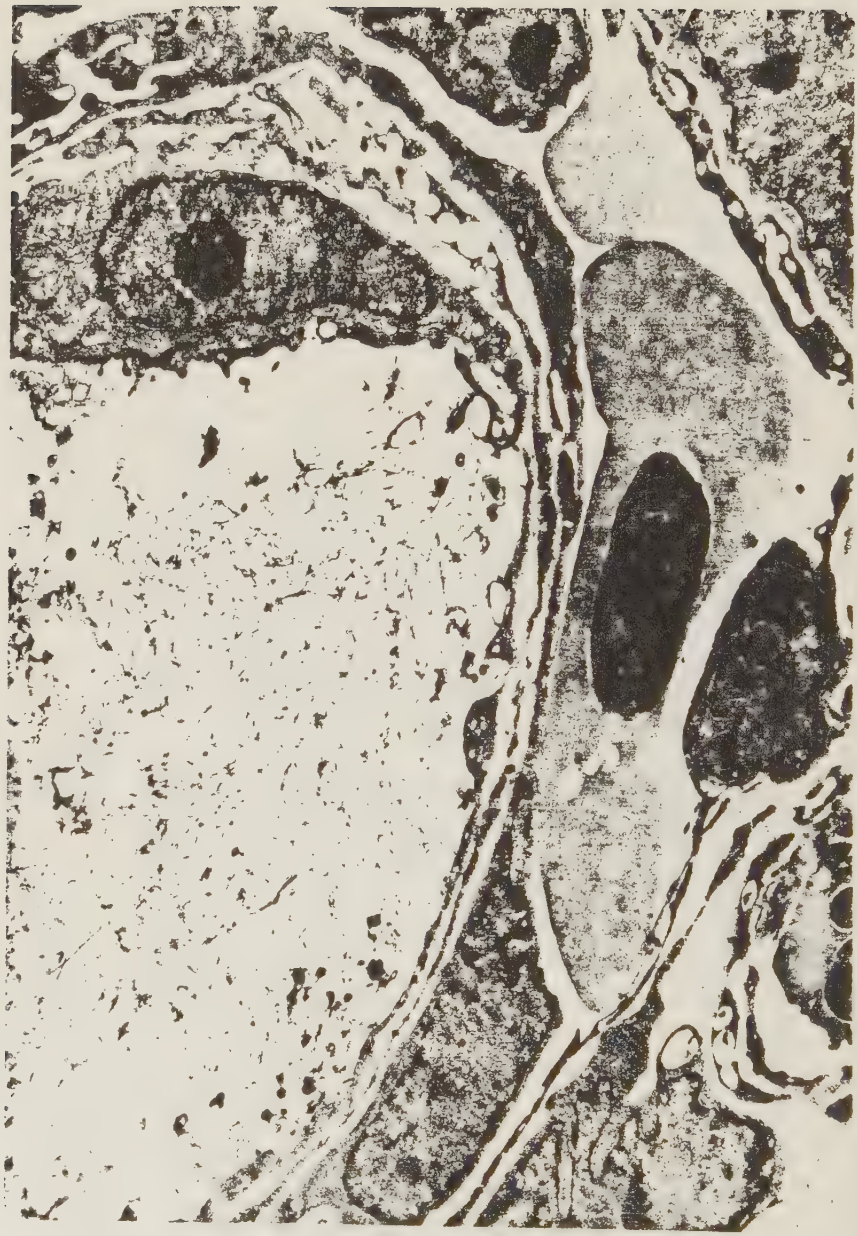


□ ·—· = Kontrolle n=6 bis 15 ◊ ·····= L-Thyroxin (0,006mg) n=6

○ —— = Thioharnstoff (2,5mg) n=6 bis 7 • ····· = Indomethazin (2mg) n=6

+ ----= T_4-Antiserum (1:100, 0,1ml) n = 6 n = Anzahl der Versuche

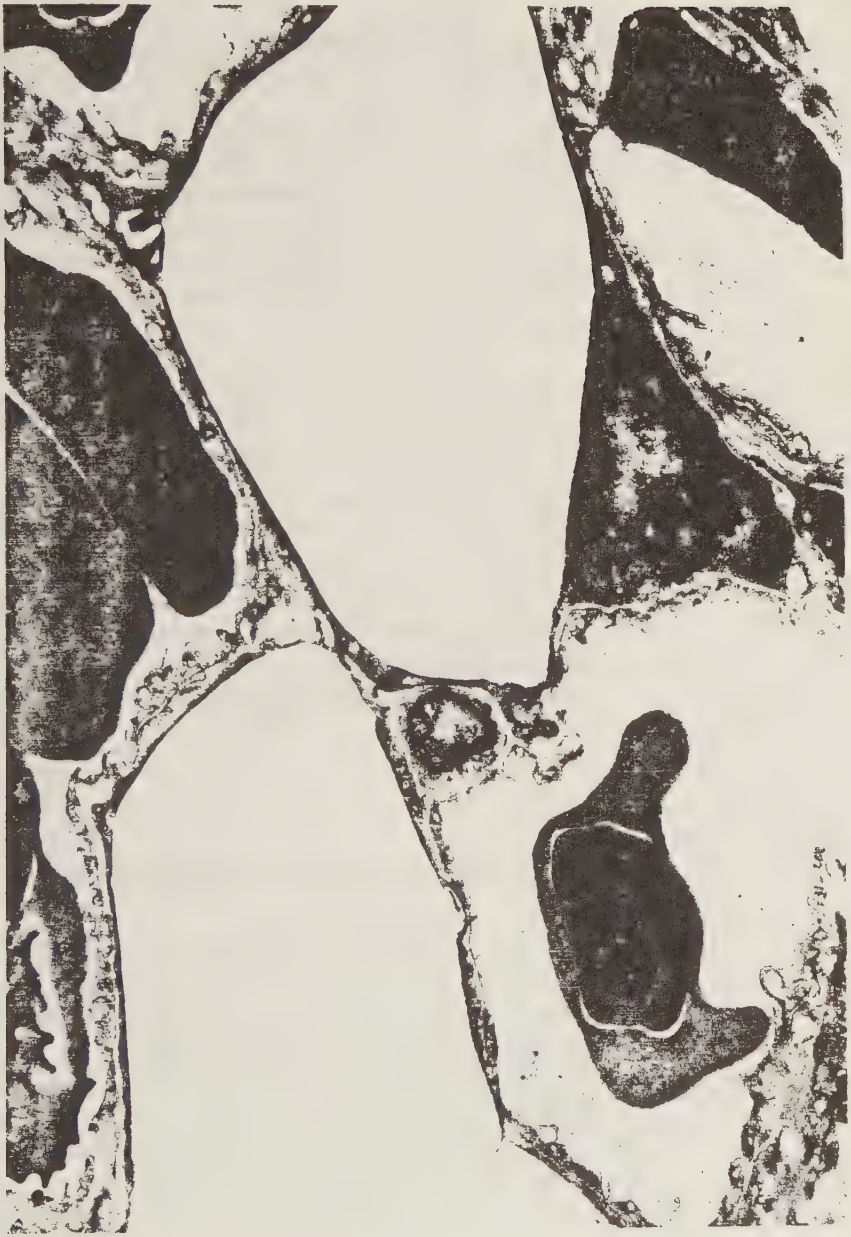
+ p ≤ 0,05 ++ p ≤ 0,01 +++ p ≤ 0,001



1µm

Abb. a: Thioharnstoff 23. Bebrütungstag

Deutlich erkennbare Flüssigkeitsansammlung in der Luftkapillare (linke Bildhälfte)



1 µm

Abb. b: Kontrolle 20. Bebrütungstag, Lunge beatmet
Die beiden Luftkapillaren in der Bildmitte sind frei

f) Der Einbau von L- [U-^{14}C] Leucin in das Lungenprotein

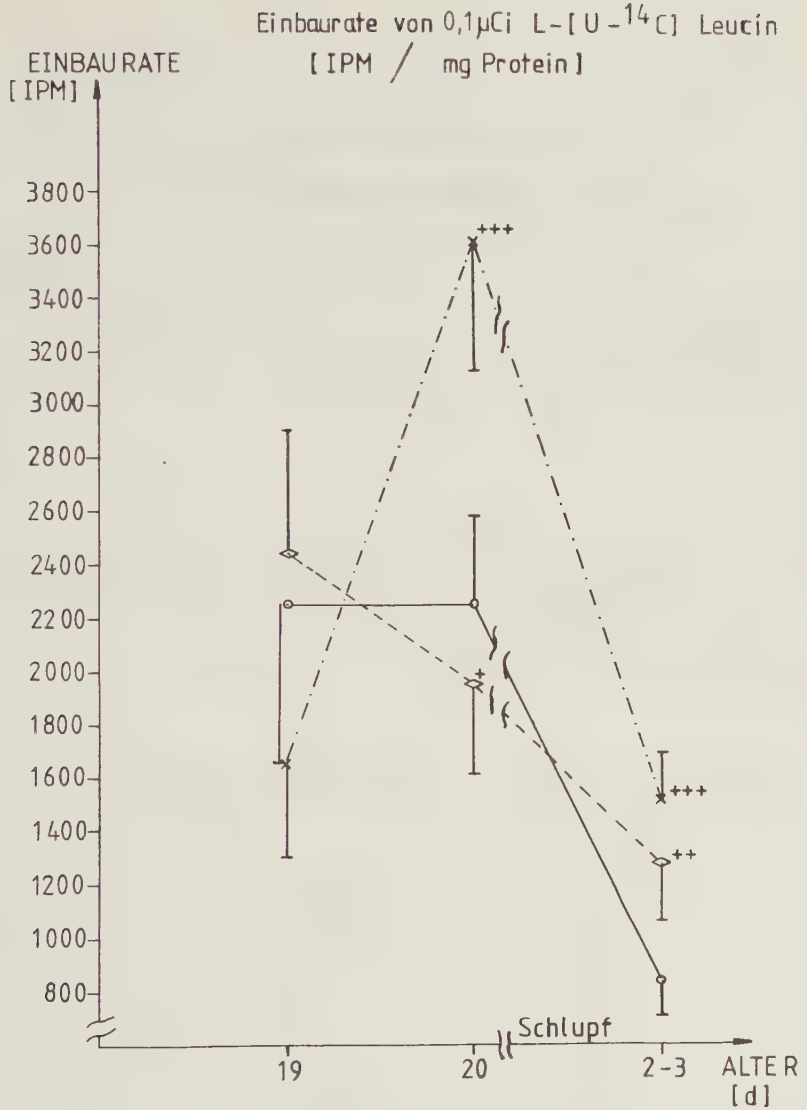
Bekanntlich entfalten die Schilddrüsenhormone ihre stimulierende Wirkung auf die Entwicklung über eine Stimulierung der Proteinsynthese. Im folgenden wurde daher untersucht, ob nach Applikation von L-Thyroxin Hinweise auf eine gesteigerte und nach Applikation von Thioharnstoff auf eine reduzierte Proteinsynthese gegeben sind. Die Ergebnisse sind in Fig. 2 dargestellt.

Unter dem Einfluß von L-Thyroxin war der Einbau von radioaktivmarkiertem Leucin in das Lungenprotein am 20. Bebrütungstag etwas geringer und am 2. - 3. Lebenstag etwas höher als bei den Kontrolltieren. Unter dem Einfluß von Thioharnstoff erhöhte sich der Einbau vom 19. zum 20. Bebrütungstag drastisch. Auch postnatal lagen die Werte dieser Tiere noch deutlich über denen der Kontrolltiere. Im Gegensatz zu den beiden anderen Versuchsgruppen wiesen die mit Thioharnstoff behandelten Tiere in der postnatalen Phase keine im Vergleich zum 19. Bebrütungstag verminderte Einbaurate von L- [U-^{14}C] Leucin auf.

g) Die Metabolisierung von Glucose in Lungenschnitten

Nachdem um die Zeit der beginnenden Lungenatmung der Blutglucosespiegel ansteigt, interessierte die Frage, ob dieser Anstieg mit einer Steigerung der Glucoseumsatzkapazität einhergeht. Es wurde daher der Glucoseabbau in der Lunge vor (17. Bebrütungstag) und nach dem Einsetzen (20./21. Bebrütungstag) der Lungenatmung bestimmt. Gleichzeitig wurde auch die Lactatkonzentration im Inkubationsansatz ermittelt (Tab. 10).

FIGUR 2



n= Anzahl der Versuche

Tabelle 10

Glucoseabbau und Lactatbildung in Lungenschnitten unterschiedlicher Entwicklungsstufen

Bebrütungsdauer (Tage)	Glucoseabbau (Glucose µmol/g Lunge)	Lactatbildung (Lactat µmol/g Lunge)
17	2,96 ± 0,42	3,35 ± 1,14
20/21	3,11 ± 0,94	3,94 ± 0,53

n = 8

Wie Tab. 10 zeigt, geht die Entfaltung der Lunge nicht mit einer Steigerung des Glucoseumsatzes einher. Auch konnten keine Veränderungen in der Lactatproduktion zwischen den beiden Entwicklungsstufen festgestellt werden.

h) DNS-Gehalt der lyophilisierten Kükenlungen

Abschließend interessierte, ob die Applikation von L-Thyroxin, Thioharnstoff oder T_4-Antiserum den DNS-Gehalt des Lungengewebes beeinflußt. Dabei (Tab. 11) konnte in der pränatalen Entwicklungsphase kein Unterschied zwischen den einzelnen Versuchsgruppen ermittelt werden. Postnatal allerdings war der Gehalt der Lungen an DNS bei den behandelten Tieren deutlich höher als bei den Kontrolltieren. Der bei den Kontrolltieren nach dem Schlupf zu beobachtende Abfall des DNS-Gehaltes blieb bei den behandelten Tieren aus.

Tabelle 11

Der Einfluß applizierter Substanzen

auf den DNS-Gehalt der lyophilisierten Kükenlunge

Entwicklungsphase	pränatal	postnatal
	DNS mmol/g	
Kontrolle	2,10(14) ± 0,19	1,62(7) ± 0,21
L-Thyroxin	2,00(6) ± 0,04	$2,04(6)^{+++}$ ± 0,06
Thioharnstoff	1,95(12) ± 0,17	$2,11(6)^{+++}_{x}$ ± 0,06
T_4-Antiserum	1,97(15) ± 0,19	$1,96(6)^{++}$ ± 0,08

$^{++}$: $p \leq 0,01$
$^{+++}$: $p \leq 0,001$
} verglichen mit gleichaltrigen Kontrollen

x Eischale angepickt

III. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde der Lungenstoffwechsel embryonaler Küken um die Zeit der beginnenden Atmung untersucht. Dabei stand der Lipidstoffwechsel wegen seiner herausragenden Bedeutung bei der Aufnahme der Lungenfunktion im Vordergrund. Ein besonderer Vorteil bei den Untersuchungen war es, daß - wie in einer anderen Studie gezeigt werden konnte (42) - die Lungenreifung durch L-Thyroxin beschleunigt und durch Thioharnstoff verzögert oder ganz unterdrückt werden konnte. Dadurch ließ sich die Abhängigkeit des Atmungsgeschehens vom Stoffwechsel besonders gut studieren.

Die Untersuchungen mit L-Thyroxin bzw. Thioharnstoff zeigten, daß zeitliche Verschiebungen des Atmungsbeginns parallel zur Phosphatidylcholinsynthese verlaufen (Tab. 5). Der Einbau von Cholin in Phosphatidylcholin war gesteigert (20. Bebrütungstag), wenn unter dem Einfluß von L-Thyroxin ein vorzeitiges Einsetzen der Lungenatmung induziert wurde. Umgekehrt löste Thioharnstoff neben der verzögerten Lungenatmung eine verringerte Phosphatidylcholinsynthese innerhalb der regulären Inkubationsdauer aus. Allerdings schloß sich dann wieder eine Phase der gesteigerten Phosphatidylcholinsynthese an, wenn in den darauffolgenden Tagen die Lungenatmung einsetzte und die Eischale angepickt wurde. Offensichtlich ist zu diesem Zeitpunkt die hemmende Wirkung auf die Atmung und die Phosphatidylcholinsynthese wieder beseitigt.

Ähnliche Verhältnisse hinsichtlich der Phosphatidylcholinsynthese wie bei den mit Thioharnstoff behandelten Tieren waren auch nach einer Behandlung mit T_4-Antiserum zu beobachten. Es ist daher die Annahme berechtigt, daß es sich in beiden Fällen um einen thyreostatischen Effekt handelt, der aller Wahrscheinlichkeit nach dadurch zustande kommt, daß die stimulierende Wirkung der Schilddrüsenhormone auf die Phosphatidylcholinsynthese in den Pneumozyten II unterdrückt wird (4, 5).

Obgleich in den Versuchen eine Parallelität zwischen Phosphatidylcholinsynthese und dem Beginn der Lungenatmung bei mit Thioharnstoff bzw. L-Thyroxin behandelten Tieren aufgezeigt werden konnte, darf daraus noch nicht der Schluß gezogen werden, daß generell beim Kükenembryo das Ausmaß der Phospholipidsynthese die Lungenreifung bestimmt, wie dies für den Säugetier- und den Menschenembryo angenommen wird (57). Gegen einen derartigen Zusammenhang spricht der Befund, daß die Stimulierung der Phosphatidylcholinsynthese durch Dexamethason nicht wie nach Verabreichung von L-Thyroxin auch mit einer vorzeitigen Lungenentfaltung einherging und außerdem die Hemmung der Phosphatidylcholinsynthese durch T_4-Antiserum bzw. Indomethazin keine Verzögerung der Lungenentfaltung und des Schlupfes auslöste.

Schließlich standen die Phosphatidylcholinkonzentrationen in der Lunge in keiner Relation zur Lungenreifung (Tab. 4). Überraschend war vor allem, daß die Verabreichung von Thioharnstoff und nicht von L-Thyroxin eine Steigerung der Phosphatidylcholinkonzentration in der Lunge zur Folge hatte, obgleich in In-vitro-Versuchen der Cholineinbau unter dem Einfluß von Thioharnstoff deutlich geringer war als unter dem Einfluß von L-Thyroxin.

Daß die unter dem Einfluß von Thioharnstoff erhöhte Phosphatidylcholinkonzentration über eine Stimulierung des Phosphatidyläthanolaminweges (s. I. 5.) intensiviert wird, ist nicht sehr wahrscheinlich, obgleich es aufgrund der erhöhten Einbaurate von Methionin (Tab. 6) nach Thioharnstoffgaben nicht völlig ausgeschlossen werden kann. Einerseits nimmt nämlich dieser zweite Weg der Phosphatidylcholinsynthese gegen den Schlupf zu ab (Tab. 6), andererseits ist er verglichen mit der Syntheserate aus Cholin von weitaus geringerer Bedeutung.

Es ist schließlich auch nicht sehr wahrscheinlich, daß der überraschend hohe Phosphatidylcholingehalt in den Lungen thioharnstoffbehandelter Embryonen auf humoralem Wege entsteht, da das Serum dieser Tiere erniedrigte Werte von Phosphatidylcholin aufwies.

Außerdem steht in der Lunge die Eigensynthese von Phosphatidylcholin durch die hierfür spezialisierten Pneumozyten II im Vordergrund. Es bleibt jedoch die Möglichkeit, daß bei thioharnstoffbehandelten Embryonen eine Hemmung des Abbaus zu einer Akkumulierung von Phosphatidylcholin führt.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Eingriffe in die Lungenreifung nicht über die veränderte Phosphatidylcholinsynthese zustande kommen und demnach auch nicht mit der Ausbildung des Surfactant in Zusammenhang stehen. Möglicherweise kommt dem Surfactant des Hühnerkükens bei der Lungenreifung eine nicht mit den Verhältnissen beim Säugetier vergleichbare Funktion zu. Diese Meinung wurde in der Literatur bereits wiederholt vertreten (24, 56).

Es erhebt sich die Frage, wodurch die auffallend lang andauernde bzw. die zum Teil völlige Unterdrückung der Lungenatmung nach einer Behandlung mit Thioharnstoff bedingt ist. Zur Klärung dieser Frage ist der Befund interessant, daß bei Embryonen, deren Lungenatmung beeinträchtigt war, kein Anstieg der Hämoglobinkonzentration in der Lunge zu beobachten war. Dies kann als Anzeichen dafür angesehen werden, daß die funktionelle Durchblutung der Lunge nicht eingeleitet wurde und folglich auch der Gasaustausch über die Lunge nicht vollzogen werden konnte.

Nach neueren Befunden (20) löst Thioharnstoff in der Lunge einen Anstieg der Leucotriene aus. Dieser sich von der Arachidonsäure ableitende Verbindungsgruppe wird eine vasokonstriktorische Wirkung zugeschrieben, die letztlich auch die Ursache für die unterdrückte Lungendurchblutung darstellen könnte.

Schließlich wurde bei Embryonen mit unterdrückter Lungenatmung eine Flüssigkeitsansammlung in den Luftkapillaren beobachtet (Abb. a). Daß Thioharnstoff ödematöse Veränderungen in der Lunge auszulösen vermag, ist seit langem bekannt (26). Speziell für den hier angesprochenen Entwicklungsstatus erhebt sich die Frage, ob die Flüssigkeitsansammlung durch eine erhöhte Permeabilität der

Blutkapillaren in der Lunge oder durch eine verminderte Flüssigkeitsresorption aus den Luftkapillaren bedingt ist. Wie im allgemeinen Teil ausgeführt wurde, wird die Flüssigkeit, die sich im Endabschnitt der Embryogenese in den frisch entstandenen Luftkapillaren befindet, über die Blutkapillaren resorbiert. Sicherlich darf man davon ausgehen, daß die in den Luftkapillaren angestaute Flüssigkeit den Gasaustausch über die Lunge verhindert.

Der Cholesteringehalt in der Lunge erhöhte sich vom 17./18. Bebrütungstag bis in die neonatale Entwicklungsphase hinein. Eine Parallelität zwischen der Cholesterinkonzentration einerseits und dem Beginn der Lungenatmung andererseits ließ sich bei den verschiedenen Versuchsgruppen nicht aufzeigen.

Die Veränderungen des Cholesteringehaltes verliefen aber weitgehend parallel zu denen im Blut. Auch bei den Triglyceriden ergaben sich keine Hinweise darauf, daß deren Konzentration mit der Lungenfunktion in Zusammenhang steht. Im Gegensatz zum Cholesterin verringerte sich die Triglyceridkonzentration beim Übergang von der prä- in die neonatale Entwicklungsphase.

Diese Befunde deuten darauf hin, daß die Cholesterin- wie auch die Triglyceridversorgung der Lunge über das Blut erfolgt, wobei die Vorräte im Ei als Quelle anzusehen sind (69). Bekanntlich weist das Vogelei beträchtliche Mengen an Triglyceriden und Cholesterin auf (3). Die Triglyceride dürften in diesem Entwicklungsstatus - ähnlich wie dies für den embryonalen aviären Organismus überwiegend gilt - im Dienste des Energiestoffwechsels stehen.

Zwar haben die In-vitro-Versuche gezeigt, daß die Lunge bereits in der embryonalen Entwicklungsphase einen bemerkenswerten Glucoseumsatz aufweist; es ist jedoch fraglich, ob die gemessenen Werte auch in vivo Gültigkeit haben. Zum einen verfügt die embryonale Vogellunge nämlich nicht wie die der Säugetiere über eigene Kohlehydratreserven (18, 63), zum anderen wird die in der Leber und der Niere pränatal gebildete Glucose als Glycogen gespeichert.

Zu einem Anstieg der Blutglucose kommt es daher erst kurz vor dem Schlupf, wenn die Glycogenreserven abgebaut werden. Erst dies dürfte zu einer nennenswerten Steigerung des Glucoseumsatzes in der Lunge führen.

Auffallend war schließlich der hohe Leucineinbau in das Lungenprotein von thioharnstoffbehandelten Embryonen. Da Thioharnstoff hemmend auf die anabol wirkenden Schilddrüsenhormone wirkt, wäre eher mit einer Abnahme des Leucineinbaus zu rechnen gewesen. Nun fällt in Fig. 2 auf, daß die Beschleunigung der Lungenentfaltung durch L-Thyroxin mit einer vorzeitigen Abnahme des Leucineinbaus einhergeht. In dieser Phase wird unter dem Einfluß von Thioharnstoff der Einbau des Leucins offensichtlich drastisch stimuliert. Erst dann folgt ebenfalls eine Phase verringerten Einbaus. Die Ursachen hierfür sind nicht bekannt. In diesem Zusammenhang ist zu vermerken, daß auch HOLLINGER et al. (36) bei der Rattenlunge einen gesteigerten Leucineinbau nach Behandlung mit Thioharnstoff beobachteten. Die Autoren führen dieses Phänomen jedoch auf eine starke leukozytäre Infiltration zurück.

IV. ZUSAMMENFASSUNG

Die metabolischen Vorgänge, die bei der Entfaltung der Vogellunge eine Rolle spielen, sind weitgehend unbekannt. Beim Säugetier wird in Verbindung mit der Surfactant-Bildung in der Lunge dem Lipidstoffwechsel eine wichtige Funktion zugeschrieben. Ausgehend von dieser Vorstellung wurde in der vorliegenden Arbeit der Lungenstoffwechsel des Hühnerkükens um die Zeit der einsetzenden Lungenatmung studiert. Dabei wurde dem Lipidstoffwechsel besondere Aufmerksamkeit geschenkt.

Die Untersuchungen wurden an Embryonen mit normaler Lungenreifung und an Embryonen, deren Lungenreifung mit L-Thyroxin beschleunigt und mit Thioharnstoff verzögert bzw. völlig unterdrückt wurde, durchgeführt.

Aus ihnen wird ersichtlich, daß sich die Beschleunigung bzw. die Hemmung der Lungenreifung durch L-Thyroxin bzw. Thioharnstoff parallel zur Phosphatidylcholinsynthese vollzieht. Ein genereller funktioneller Zusammenhang zwischen dem Beginn der Lungenatmung einerseits und der Phosphatidylcholinsynthese andererseits ist offensichtlich nicht gegeben. Dies läßt sich aus Untersuchungen ableiten, in denen die Phosphatidylcholinsynthese aktiviert (Dexamethason) bzw. verringert (T_4-Antiserum, Indomethazin) wurde, ohne daß sich der Zeitpunkt des Beginns der Lungenatmung veränderte. Außerdem ließ sich kein Zusammenhang zwischen dem Beginn der Lungenatmung und der Phosphatidylcholinkonzentration in der Lunge ableiten.

Die Verzögerung bzw. Unterdrückung der Lungenatmung durch Thioharnstoff scheint durch eine gehemmte Blutzirkulation und eine Flüssigkeitsansammlung in der Lunge verursacht zu sein.

Die Veränderungen der Triglycerid- und Cholesterinkonzentrationen in der Lunge vollzogen sich parallel zu den Veränderungen der Blutkonzentrationen. Die Versorgung der Lunge mit diesen Lipiden dürfte in erster Linie über die entsprechenden Vorräte aus dem Ei erfolgen.

V. ABSTRACT

On the lipid metabolism of chicken lungs during the perinatal period.

The metabolic processes involved in the development of avian lungs are not understood. As to the surfactant synthesis, in mammalian lungs an important function is attributed to the lipid metabolism.

On the basis of this idea, in the work presented here lung metabolism has been studied during the period when active breathing starts. Much emphasize has been put on lipid metabolism.

The experiments were performed with untreated embryos and with embryos, the lung development of which was accelerated by L-thyroxine and retarded or totally suppressed by thiourea.

The studies indicate that acceleration and retardation of lung development in embryos treated with L-thyroxine and thiourea, respectively, proceeds with the activity of phosphatidylcholine synthesis. Instead of this, in general, there is no functional correlation between the onset of lung ventilation on one side and on synthesis of phosphatidylcholine on the other side. This conclusion may be drawn from the finding, that synthesis of phosphatidylcholine could be enhanced (dexamethasone) or decreased (T_4-antiserum, indomethacine) without any effect on the onset of pulmonary ventilation. In addition, there was no correlation between the beginning of lung ventilation and the phosphatidylcholine concentrations in the lungs.

Retardation or suppression of lung ventilation by thiourea seems to be caused by a disturbed circulation and by an accumulation of liquid in the lungs. Changes of triglyceride and cholesterol concentrations in the lungs were in parallel to their changes of concentration in blood. The egg seems to represent the main source for supplying the lungs with these kinds of lipids.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1) AGOSTONI, E., TAGLIETTI, A. F. and SETNIKAR, J. 1958.
Mechanical Aspects of the First Breath.
J. Appl. Physiol. 13 (3), 344 - 348

2) BACHOFEN, H., GEHR, P. and WEIBEL, E. R. 1979.
Alterations of Mechanical Properties and Morphology in Excised Rabbit Lungs Rinsed with a Detergent.
J. Appl. Physiol. 47 (5), 1002 - 1010

3) BAIR, C. W. and MARION, W. W. 1978.
Yolk Cholesterol in Eggs from Various Avian Species.
Poultry Science, 57, 1260 - 1265

4) BAKHLE, Y. S. 1980.
Pulmonary Angiotensin-Converting Enzyme and its Inhibition: a Historical Survey
in: Metabolic Activities of the Lung.
Ciba Foundation Symposium 78, 275 - 292

5) BALLARD, P. L. 1980.
Hormonal Influences during Fetal Lung Development.
in: Metabolic Activities of the Lung.
Ciba Foundation Symposium 78, 251 - 274

6) BALLARD, P. L., BENSON, B. J., BREHIER, A., CARTER, J. P., KRIZ, B. M. and JORGENSEN, E. C. 1980.
Transplacental Stimulation of Lung Development in the Fetal Rabbit by 3,5 - Dimethyl - 3'-Isopropyl - L-Thyronine.
J. Clin. Invest. 65, 1407 - 1417

7) BATENBURG, J. J., POST, M., OLDENBORG, V. and VAN GOLDE, L. M. G. 1980.
The Perfused Isolated Lung as a Possible Model for the Study of Lipid Synthesis by Type II Cells in Their Natural Environment.
Exp. Lung Res. 1, 57 - 65

8) BATENBURG, J. J., POST, M. and VAN GOLDE, L. M. G. 1981.

Synthesis of Surfactant Lipids: Studies with Type II Alveolar Cells Isolated from Adult Rat Lung.
Progr. Resp. Res. 15, 1 - 9

9) BERGMEYER, H. U., BERNT, E., SCHMIDT, F. und STARK, H. 1970.

Glucose.
in: Methoden der enzymatischen Analyse.
Hrsg. H. U. Bergmeyer, 1163 - 1172

10) BETKE, K. und SAVELSBERG, W. 1950.

Stufenphotometrische Hämoglobinbestimmung mittels Cyanhämiglobin.
Biochem. Z. 320, 431 - 439

11) BEYER, R. E. 1952.

The Effect of Thyroxine upon the General Metabolism of the Intact Chick Embryo.
Endocrin. 50, 497 - 503

12) BLACKBURN, W. R., TRAVERS, H. and POTTER, D. M. 1972.

The Role of the Pituitary-Adrenal-Thyroid Axes in Lung Differentiation. I. Studies of the Cytology and Physical Properties of Anencephalic Fetal Rat Lung.
Lab. Invest. 26, 306 - 316

13) BLACKBURN, W. R., KELLY, J. S., DICKMANN, P. S., TRAVERS, H., LOPOTA, M. A. and RHOADES, R. A. 1973.

The Role of the Pituitary-Adrenal-Thyroid Axes in Lung Differentiation. II. Biochemical Studies of Developing Lung in Anencephalic Fetal Rats.
Lab. Invest. 28, 352 - 360

14) BRUMLEY, G. W., CHERMICK, V., HODSON, W. A., NORMAND, C., FENNER, A. and AVERY, M. E. 1967.

Correlations of Mechanical Stability, Morphology, Pulmonary Surfactant and Phospholipid Content in the Developing Lamb Lung.
J. Clin. Invest. 46, 863 - 873

15) BURTON, K. 1956.

Studies of the Conditions and Mechanisms of the Diphenylamine Reaction for the Colorimetric Estimation of the Desoxyribonucleic Acid.
Biochem. J. 62, 315

16) CLEMENTS, J. A. 1957.

Surface Tension in Lung Extracts.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 95, 170 - 172

17) COMPTON, S. K. and GOERINGER, G. C. 1981.

Lung Development in the Chick Embryo. I. Phosphatidylcholine Synthesis in the Developing Chick Lung.
Pediatr. Res. 15, 866 - 869

18) DAMERON, F. and MARIN, L. 1978.

The Endocrine Control of Embryonic Lung Maturation in the Chicken. II. Role of Hypophysis.
Anat. Embryol. 152, 235 - 241

19) DATTA, H., STUBBS, W. A. and ALBERTI, K. G. M. M. 1980.

Substrate Utilisation by the Lung.
in: Metabolic Activities of the Lung.
Ciba Foundation Symposium 78, 85 - 104

20) DAUBER, I., PLUSS, W., STENMARK, K., WEIL, J. and VOELKEL, L. 1983.

Leucotrienes in Thiourea Induced Lung Injury Edema.
Am. Rev. Resp. Dis. 127, 304

21) DAWES, G. S., WALKER, D. W. and JOHNSTON, B. M.
1981.

The Control of Fetal Breathing and Movements.
in: The Fetus and Independent Life.
Ciba Foundation Symposium 86, 295 - 307

22) DICKIE, K. J., MASSARO, G. D., MARSHALL, V. and MASSARO, D.
1973.

Aminoacid Incorporation into Protein of a Surface-Active Lung Fraction.
J. Appl. Physiol. 34 (5), 606 - 614

23) DIEDRICH, K., HEPP, S., WELKER, H., KREBS, D., BEUTLER, H.-O. und MICHAL, G.
1979.

Die enzymatische Lecithinbestimmung im Fruchtwasser zur Beurteilung der fetalen Lungenreife.
Geburtsh. u. Frauenheilk. 39, 849 - 856

24) DUNCKER, H. R. 1978.

Development of Avian Respiratory and Circulatory Systems
in: Respiratory Function in Birds, Adult and Embryonic.
ed. Johannes Piiper, 260 - 273

25) DUNCKER, H. R. 1978.

General Morphological Principles of Amniotic Lungs.
in: Respiratory Function in Birds, Adult and Embryonic.
ed. Johannes Piiper, 2 - 15

26) ENDERS, E. 1970.

Organische Rodentizide.
in: Chemie der Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmittel
Hrsg. Wegler, R. 1, 603 - 607

27) FARIDY, E. E. and MAIMARK, A. 1971.

Effect of Distension on Metabolism of Excised Dog Lung.
J. Appl. Physiol. 31, 31 - 37

28) FARIDY, E. E. 1981.

Fetal Lung Development in Surgically Induced Prolonged Gestation.
Respir. Physiol. 45, 153 - 166

29) FARRELL, P. M. and ZACHMAN, R. D. 1973.

Induction of Choline Phosphotransferase and Lecithin Synthesis in the Fetal Lung by Corticosteroids.
Science 179, 297 - 298

30) FARRELL, P. M., LUNDGREN, D. W. and ADAMS, A. J. 1974.

Choline Kinase and Choline Phosphotransferase in Developing Fetal Rat Lung.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 57 (3), 696 - 701

31) FOLCH, J., LEES, M. and SLOANE-STANLEY, G. H. 1957.

A Simple Method for the Isolation and Purifikation of Total Lipids from Animal Tissues.
J. Biol. Chem. 226, 497 - 509

32) FUJIWARA, T., ADAMS, F. H., SIPOS, S. and EL-SALAWY, A. 1968.

"Alveolar" and Whole Lung Phospholipids of the Developing Fetal Lamb Lung.
Am. J. Physiol. 215, 375 - 382

33) GOERKE, J. 1974.

Lung Surfactant
Biochem. Biophys. Acta 344, 241 - 261

34) HEYMANN, M. A., RUDOLPH, A. M., NIES, A. S. and MELMON, K. L. 1969.

Bradykinin Production Associated with Oxygenation of the Fetal Lamb.
Circulation Research 25, 521 - 534

35) HOHORST, H. J. 1970.

Lactat.
in: Methoden der enzymatischen Analyse.
Hrsg. H. U. Bergmeyer, 1425 - 1429

36) HOLLINGER, M. A., GIRI, S. N., HWANG, F. and BUDD, E. 1974.

Effect of Thiourea on Rat Lung Protein Synthesis.
Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol. 8 (2), 319 - 326

37) HYMAN, A. L., MATHE, A. A., LIPPTON, H. L. and KADOWITZ, P. J. 1981.

Prostaglandins and the Lung.
Med. Clin. North Am. 65, 789 - 808

38) JONES, T., MASSON, P., HAMEL, R., BRUNET, G., HOLME, G., GIRARD, Y., LARUE, M. and ROKACH, J. 1982.

Biological Activity of Leucotriene Sulfones on Respiratory Tissues.
Prostaglandins 24, 279 - 291

39) KANOH, H. 1970.

Biosynthesis of Lecithins and Phosphatidylethanolamines from Various Radioactive 1,2 - Diglycerides in Rat Liver Microsomes.
Biochem. Biophys. Acta 218, 249 - 258

40) KING, R. J. and CLEMENTS, J. A. 1972.

Surface Active Materials from Dog Lung. II. Composition and Physiological Correlations.
Am. J. Physiol. 223, 715 - 726

41) KING, R. J. 1974.

The Surfactant System of the Lung.
Federation Proc. 33, 2238 - 2247

42) KUGLER, W.

Diss. med. vet. München in Vorbereitung

43) LEVIN, D. L., MILLS, L. J., PARKEY, M., GARRIOTT, J. and CAMPBELL, W. 1979.

Constriction of the Fetal Ductus Arteriosus after Administration of Indomethacin on the Pregnant Ewe.
J. Pediatr. 94 (4), 647 - 650

44) LIGGINS, G. C. and KITTERMAN, J. A. 1981.

Development of the Fetal Lung.
in: The Fetus and Independent Life.
Ciba Foundation Symposium 86, 308 - 330

45) MARCELLO, F., SAGGIO, A., CINA', C. and BANNA, P. 1980.

Considerations on the Origin and Ultrastructural Aspects of Type II Pneumocytes under Normal Conditions and Endotoxinic Shock Experimentally Induced in Dogs.
Biochem. Exp. Biol. 16 (1), 23 - 29

46) MARIN, L., TORDET, C. and DAMERON, F. 1978.

The Endocrine Control of Embryonic Lung Maturation in the Chicken. I. Morphological and Biochemical Differentiation of Lungs after "in ovo" Decapitation.
Anat. Embryol. 152, 223 - 234

47) MELLINS, R. B., DAVIDSON, D. and STALCUP, S. A. 1980.

Non-respiratory Functions of the Lung in the Perinatal Period.
in: Metabolic Activities of the Lung.
Ciba Foundation Symposium 78, 313 - 331

48) MICHEL, G. 1972.

Die Eihüllen des Vogels.
in: Kompendium der Embryologie der Haustiere, 159 - 162

49) MILLER, D. A. and BONDURANT, S. 1961.

Surface Characteristics of Vertebrate Lung Extracts.
J. Appl. Physiol. 16, 1075 - 1077

50) MORISHIGE, W. K. 1980.

Endocrine Influences on Aspects of Lung Biochemistry.
in: Metabolic Activities of the Lung.
Ciba Foundation Symposium 78, 239 - 250

51) NICKEL, R., SCHUMMER, A. und SEIFERLE, E. 1973.

Atmungssystem
in: Lehrbuch der Anatomie der Haustiere 5, 63 - 68

52) O'BRIEN, W. F., CEFALO, R. C., LEWIS, P. E., FLETCHER, J. R. and RAMWELL, P. W. 1981.

The Role of Prostaglandins in Endotoxemia and Comparison in Response in the Nonpregnant, Maternal and Fetal Experimental Animal. II. Alterations in Prostaglandin Physiology in the Nonpregnant, Pregnant and Fetal Experimental Animal.
Am. J. Obstet. Gynecol. 139, 535 - 539

53) OYARZUN, M. J. and CLEMENTS, J. A. 1977.

Ventilatory and Cholinergic Control of Pulmonary Surfactant in the Rabbit.
J. Appl. Physiol. 43, 39 - 45

54) PATTLE, R. E. 1955.

Properties, Function and Origin of the Alveolar Lining Layer.
Nature 175, 1125 - 1126

55) PATTLE, R. E., ROSSDALE, P. D., SCHOCK, C. and CREASEY, J. M. 1975.

The Development of the Lung and Its Surfactant in the Foal and Other Species.
J. Reprod. Fert. Suppl. 23, 651 - 657

56) PATTLE, R. E. 1978.

Lung Surfactant and Lung Lining in Birds.
in: Respiratory Function in Birds, Adult and Embryonic. ed. Johannes Piiper, 23 - 32

57) PERELMAN, R. H., ENGLE, M. J. and FARRELL, P. M. 1981.

Perspectives on Fetal Lung Development.
Lung 159, 53 - 80

58) PIIPER, J. and SCHEID, P. 1981.

Oxygen Exchange in the Metazoa.
in: Oxygen and Living Processes.
ed. D. L. Gilbert, 150 - 176

59) POST, M., BATENBURG, J. J. and VAN GOLDE, L. M. G. 1980.

Effects of Cortisol and Thyroxine on Phosphatidylcholine and Phosphatidylglycerol Synthesis by Adult Rat Lung Alveolar Type II Cells in Primary Culture.
Biochem. Biophys. Acta 618, 308 - 317

60) POST, M., BATENBURG, J. J., SCHUURMANS, E. A. J. M. and VAN GOLDE, L. M. G.
1980.

Phospholipid-Transfer Activity in Type II Cells Isolated from Adult Rat Lung.
Biochem. Biophys. Acta 620, 317 - 321

61) POST, M., BATENBURG, J. J., SCHUURMANS, E. A. J. M. LAROS, C. D. and VAN GOLDE, L. M. G.
1982.

Lamellar Bodies Isolated from Adult Human Lung Tissue.
Exp. Lung Res. 3, 17 - 28

62) RADFORD, E. P. 1957.

Recent Studies of Mechanical Properties of Mammalian Lungs.
in: Tissue Elasticity.
ed. J. W. Remington, 177

63) RIUANDO, M. T., CURTO, M., BRUNO, R. and PONZETTO, C.
1981.

Some Aspects of Carbohydrate Metabolism in Rat Lung during the Period of Growth.
Int. J. Biochem. 13, 571 - 575

64) RÖSCHLAU, P., BERNT, E. und GRUBER, W. 1974.
Enzymatische Bestimmung des Gesamtcholesterins im Serum.
Z. klin. Chem. klin. Biochem. 9, 403 - 407

65) ROMANOFF, A. L. and LAUFER, A. J. 1948
The Effect of Injected Thiourea on the Development of some Organs of the Chick Embryo.
Endocrinol. 59, 611 - 619

66) SACHS, L. 1971.
Statistische Auswertungsmethoden.
Springer Verlag, Berlin

67) SALISBURY-MURPHY, S., RUBINSTEIN, D. and BECK, J. C. 1966.
Lipid Metabolism in Lung Slices.
Am. J. Physiol. 211, 989 - 992

68) SCHOLANDER, P. F. and EDWARDS, G. A. 1942.
Micro-Respiration Apparatus.
Rev. Sci. Instrum. 13, 292 - 295

69) STOKES, W. M., FISH, W. A. and HICKEY, F. C. 1953.
Metabolism of Cholesterol in the Chick Embryo. I. Synthesis of Cholesterol.
J. Biol. Chem. 200, 683 - 689

70) STUBBS, W. A. and ALBERTI, K. G. M. M. 1980.

The Lung, Whole-Body Metabolism and Disease. in: Metabolic Activity of the Lung. Ciba Foundation Symposium 78, 351 - 372

71) SUZUKY, Y., NAKAI, E. and OHKAWA, K. 1982.

Experimental Studies on the Pulmonary Surfactant. Reconstitution of Surface-active Material. J. Lipid. Res. 23, 53 - 61

72) TRÄUBLE, H., EIBL, H. and SAWADA, H. 1974.

Respiration - a Critical Phenomenon? Lipid Phase Transitions in the Lung Alveolar Surfactant. Naturwissenschaften 61, 344 - 354

73) UPRETI, R. K. 1980.

Age Dependent Variations in Choline and Ethanolamine Phosphorylating Activities of Rodents. Biochem. Exp. Biol. 16 (3), 221 - 226

74) VAN GOLDE, L. M. G., OLDENBORG, V., POST, M., BATENBURG, J. J., POORTHUIS, B. J. H. M. and WIRTZ, K. W. A. 1980.

Phospholipid Transfer Proteins in Rat Lung. J. Biol. Chem. 255 (13), 6011 - 6013

75) VON NEERGAARD 1929.

Neue Auffassungen über einen Grundbegriff der Atemmechanik. Die Retraktionskraft der Lunge abhängig von der Oberflächenspannung in den Alveolen. A. Gesamte Exp. Med. 66, 373 - 394

76) WAHLEFELD, W. A. 1974.

Triglyceride. Bestimmung nach enzymatischer Verseifung.
in: Methoden der enzymatischen Analyse.
Hrsg. H. U. Bergmeyer, 1878 - 1882

77) WEISS, A. 1979.

Der Einfluß des Thyroxins und Thioharnstoffs auf biochemische Vorgänge der Kükenleber in der perinatalen Phase.
Diss. med. vet. München

78) WOLFE, B. M. J., ANHALT, B., BECK, J. C. and RUBINSTEIN, D.
1970.

Lipid Metabolism in Rabbit Lungs.
Can. J. Biochem. 48, 170 - 177

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. H. Zucker für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes bedanken.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Herrn Priv. Doz. Dr. Dr. habil. J. Wittmann für die Überlassung des Themas und die vielen, bereitwillig gegebenen Hinweise und Anregungen zu dieser Arbeit.

Dank schulde ich auch Herrn Professor Dr. H. G. Liebich, Institut für Histologie und Embryologie der Tierärztlichen Fakultät München für die Herstellung der elektronenmikroskopischen Bilder.

Ich danke auch Frau B. Hofer, deren Erfahrung bei meinen Experimenten eine große Hilfe war.

LEBENSLAUF

04. Juni 1955	geboren in Bad Mergentheim Vater : Walter Hammel Mutter: Irmgard Hammel, geb. Bauer
1962 - 1966	Grundschule Bad Mergentheim
1966 - 1974	Deutschorden-Gymnasium Bad Mergentheim
22. Juni 1974	Abitur
1974 - 1976	Wehrdienst
1976 - 1981	Studium der Tiermedizin an der LMU München
seit 10. April 1980	verheiratet mit Ehefrau Renate, geb. Hauf
16. Februar 1982	Approbation zum Tierarzt
1982 - 1983	Doktorand am Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungs- physiologie der Tierärztlichen Fakultät der LMU München
03. August 1982	Geburt der Tochter Franziska
seit September 1983	Assistenztierarzt in einer Gemischtpraxis